

Univerzita Karlova
Pedagogická fakulta
Katedra biologie a environmentálních studií

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Praktické využití plazmidů
Practical applications of plasmids
Barbora Semencová

Vedoucí práce: PhDr. Lucie Hlaváčová, Ph.D.
Studijní program: Specializace v pedagogice
Studijní obor: Biologie, geologie a environmentalistika se zaměřením na
vzdělávání — Chemie se zaměřením na vzdělávání

2017

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma Praktické využití plazmidů vypracovala pod vedením vedoucího práce samostatně za použití v práci uvedených pramenů a literatury. Dále prohlašuji, že tato práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Praze dne 13.4.2017

.....

podpis

Mé poděkování patří především vedoucí mé bakalářské práce PhDr. Lucii Hlaváčové, Ph.D. za odborné vedení a předání cenných rad a zkušeností, ochotu a vstřícný přístup během zpracování mé bakalářské práce.

ANOTACE

Tato práce se věnuje tématu bakteriálních plazmidů a jejich využití v praktických odvětvích lidského života.

První část se zabývá obecným vymezením pojmu plazmid, jakou má funkci v bakteriálním organismu, kde se tyto molekuly nalézají, jaká je jejich struktura a jak se přenáší mezi bakteriemi. Poté je definováno využití plazmidů v genovém inženýrství, vysvětlen pojem rekombinace *in vitro* a podrobně popsány mechanismy a proces klonování DNA.

Druhá část této práce poukazuje na jednotlivá odvětví, kde se mohou plazmidy využívat. Jsou uvedeny některé konkrétní příklady, mezi nimi hlavně tvorba farmaceuticky důležitých proteinů, transgenních rostlin a řešení kontaminace životního prostředí degradními plazmidy. Konec této práce shrnuje nabyté poznatky a také představuje možnosti, jak by plazmidy mohly být využity v budoucnu především v medicíně a obnovitelných zdrojích.

KLÍČOVÁ SLOVA

Plazmid, rekombinace, klonování DNA, genové inženýrství, transgenní organismy, degradace

ANNOTATION

This thesis is devoted to the topic of bacterial plasmids and their role in practical aspects of human life.

First part deals with definition of the term plasmid, plasmid's function and position in bacterial cells, structure of these molecules and their transfer in bacterial communities. Furthermore, the use of plasmids in genetic engineering is defined. The term recombination *in vitro* will be explained, and the mechanisms and process of DNA cloning are described in detail.

Second part of this thesis refers to the individual branches where plasmids can be used. Especially creation of proteins important in the pharmaceutical industry, transgenic plants, and the way to remove environment contamination with degenerative plasmids.

Ending of this thesis summarizes acquired knowledge and also introduces ways in which plasmids could be used in the future, primarily in medicine or renewable resources.

KEYWORDS

Plasmid, recombination, DNA cloning, genetic engineering, transgenic organisms, degradation

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

GMO	Geneticky modifikovaný organismus
GMP	Geneticky modifikovaná plodina
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
RNA	Ribonukleová kyselina
Bt	Bacillus thuringiensis
DDT	1,1,1-trichlor-2,2-bis(4-chlorfenyl)ethan
PCB	Polychlorované bifenyly
OCT	Octane plasmid
EPSP	5-enolpyruvylšikimát-3-fosfátsyntáza
ALS nebo AHAS	Acetohydroxyacid synthase
2,4 - D	Kyselina 2,4 – dichlorfenoxyoctová
Ht	Herbicide Tolerant
GFP	Green fluorescent protein
RFP	Red fluorescent protein
YFP	Yellow fluorescent protein
CFP	Cyan Fluorescent Protein
BFP	Blue fluorescent protein
PCR	Polymerase chain reaction
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
T-DNA	Transferred DNA
Ti-plazmid	Tumour inducing plasmid
COL plazmid	Colicin plasmid

E. coli	Escherichia coli
CAM plazmid	Camphor plasmid
MCS	Multiple cloning site
F-plazmid	Fertility faktor
dsDNA	Double-stranded DNA
SV40	Rhesus sarcoma virus
TNT	Trinitrotoluenu
Fab	Antibody binding fragment
LTP	Lipid transfer proteins
TMV	Virus tabákové mozaiky
mRNA	Messenger RNA
pBR322	Plasmid Bolivar a Rodriguez
EKG	Elektrokardiografie
EEG	Elektroencefalografie
NIH	National Institutes of Health
cDNA	Complementary DNA
ISAAA	International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications

Obsah

1	Úvod	9
2	Literární přehled	10
2.1	Plazmidy	10
2.2	Plazmidy jako vektory pro přenos genetické informace	11
2.3	Princip klonování DNA	12
2.4	Inzerce cizorodé DNA do klonovacího vektoru	13
2.4.1	Restrikce	13
2.4.2	Ligace	15
2.4.3	Gelová elektroforéza	15
2.5	Vnesení rekombinovaného vektoru do hostitelské buňky	17
2.5.1	E. coli a její využití v GI	17
2.5.1	Agrobacterium tumefaciens a její využití při tvorbě geneticky modifikovaných rostlin	18
2.5.2	Transformace	19
2.5.3	Transfekce	21
2.6	Selekce kolonií nesoucích rekombinantní vektor	22
2.7	Rezistence bakterií k antibiotikům a s tím spojené problémy v terapii bakteriálních onemocnění	23
2.8	Fluorescenční mikroskopie a využití zeleného fluorescenčního proteinu (GFP) v genovém inženýrství	24
3	Praktické využití plazmidů	27
3.1	Produkce farmakologicky významných proteinů	27
3.1.1	Inzulin	28
3.2	Transgenní rostliny	32
3.2.1	Transgenoze geny pro toleranci k herbicidům	33

3.2.2	Transgenoze geny pro toleranci k hmyzím škůdcům	38
3.2.3	Transgenoze geny pro rezistenci vůči virům	41
3.2.4	Transgenoze geny pro toleranci vůči houbovým a bakteriálním onemocněním... ..	42
3.2.5	Produkce farmakologicky významných látek – protilátek, rostlinných vakcín, vzácných proteinů.....	44
3.2.6	Transgenoze geny pro toleranci ke stresu.....	49
3.2.7	Shrnutí	54
3.3	Degradační plazmidy v boji proti polutantům	54
3.3.1	Mikroorganismy	55
3.3.2	Rostliny.....	66
4	Diskuze	69
5	Závěr	72
6	Seznam použitých informačních zdrojů	73
7	Přílohy	78
7.1	Registr povolených GMO – souhrn	78

1 Úvod

Rozšiřující se rezistence mikroorganismů vůči antibiotikům je v současnosti stále více skloňovaným problémem komplikujícím terapii různých bakteriálních onemocnění. Protože mě toto aktuální téma velice zaujalo, začala jsem se o něj zajímat hlouběji a hledala odpověď na otázku, jak se může rezistence přenést na mikroorganismy, které byly původně na antibiotikum citlivé. Moje pátrání mě dovedlo až k plazmidům, malým kruhovým molekulám deoxyribonukleové kyseliny (DNA), které mohou nést rezistenci vůči jednomu nebo i více antibiotikům, a které se mohou přirozeně přenášet z jedné bakterie na druhou. Plazmidy jsou mimo jiné i pro tuto vlastnost velmi důležitou součástí genového inženýrství, kde se využívají jako vektory pro přenos genetické informace.

V minulosti se mi naskytla příležitost zkusit si práci s plazmidy a dozvědět se více o genovém inženýrství. Zkušenosti z konstrukce vektoru pro produkci proteinu hu-Ago1 fúzovaného se zeleným fluorescenčním proteinem a jeho exprese v savčích buňkách jsem se rozhodla uplatnit ve své bakalářské práci. Jejím cílem je popsat, co to plazmidy jsou, co musí obsahovat, aby se daly využít jako vektory pro přenos genetické informace a vysvětlit proces DNA klonování, zároveň jsem se však rozhodla přiblížit potenciální, avšak také již reálné využití těchto molekul v běžném světě mimo laboratoř.

2 Literární přehled

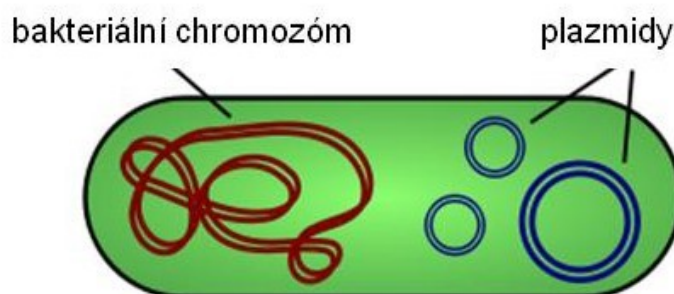
2.1 Plazmidy

Bakteriální genom je ve valné většině případů představován chromozómem tvořeným jedinou dvouvláknovou molekulou DNA (dsDNA) stočenou do kruhu a označovanou jako nukleoid (obr. 1). Bakteriální chromozóm funkčně odpovídá jádru eukaryotické buňky. Některé bakterie, a vzácně i archebakterie a eukaryota, však mohou nést i doplňkovou genetickou informaci ve formě tzv. plazmidů. Plazmidy jsou malé kruhové molekuly dsDNA (obr. 1) obsahující vlastní replikační počátek. Chovají se tedy jako autonomní replikony nezávislé na bakteriálním chromozómu. Jejich velikost je velice variabilní a pohybuje se v rozmezí od jednoho tisíce do několika set tisíc párů bází. Jsou tudíž zpravidla mnohem menší než bakteriální chromozóm, jehož velikost se pohybuje v řádu milionů párů bází (Alberts & kol., 1998).

Některé plazmidy mohou být v buňce přítomny i v několika set kopiích („high copy plasmids“), jiné jsou replikačně omezené a přítomné pouze v jediné nebo několika málo kopiích („low copy plasmids“). V jedné bakteriální buňce se navíc může vyskytovat i několik odlišných plazmidů. Plazmidy, které v jedné buňce mohou koexistovat vedle sebe, nazýváme kompatibilní. Inkompatibilní jsou pak ty, jejichž počet je regulován tak, že jich bude v buňce méně, než kdyby se vyskytovaly ve dvou různých buňkách. Příčinou inkompatibility plazmidů je podobný mechanismus jejich replikace spojený s kompeticí o enzymatickou kapacitu buňky (Alberts & kol., 1998).

Jak již bylo řečeno, plazmidy nesou doplňkovou postradatelnou genetickou informaci, která zpravidla udává selekční výhodu, např. již zmiňovanou rezistenci k antibiotikům nebo také těžkým kovům a dalším antimikrobiálním látkám. Mezi mikroorganismy mohou být plazmidy přirozeně přenášeny dvěma hlavními způsoby: konjugací a transformací. Konjugace je přenos DNA přímo z jedné bakteriální buňky (donorové) do druhé bakteriální buňky (recipientní). Nezbytným předpokladem konjugace je přítomnost tzv. „fertility faktoru“ (F-plazmidu) v donorové buňce. F-plazmid zodpovídá za vznik F-pilu, cytoplazmatického můstku sloužícího právě pro přenos DNA z jedné buňky do druhé. Transformace je proces, při kterém bakteriální buňka přijímá DNA přímo z prostředí, ve kterém žije. Buňky přijímající DNA musí být tzv. kompetentní (Alberts & kol., 1998;

Klaban, 2005). Proces transformace se hojně využívá v genovém inženýrství a více se mu tedy budu věnovat níže.



Obr. 1: Schéma bakterie nesoucí jednu kruhovou molekulu dsDNA bakteriálního chromozómu a několik menších kruhových dsDNA plazmidů.¹

2.2 Plazmidy jako vektory pro přenos genetické informace

Plazmidy se v genovém inženýrství využívají jako vektory pro přenos genetické informace. Genetickou informací se zde rozumí cizí fragment DNA, např. gen, kódující protein, který chceme zkoumat. Cizí fragment DNA lze do vektoru vložit pomocí technologie rekombinantní DNA a rekombinantní plazmid poté přenést do hostitelských buněk, kde za určitých okolností dojde k jeho kopírování (replikaci) a vstoupení do dceřiných buněk (Vondrejs, 2011).

Přirozené vektory – čili plazmidy, musí být před samotným klonováním upraveny. Každý plazmid obsahuje pro zajištění autonomní replikace určitý úsek DNA, kterou rozpoznává DNA polymeráza hostitelské buňky. Tato sekvence se označuje jako origin (*ori*), čili replikační počátek. Dále obvykle nese gen, který přináší hostitelským buňkám, ve kterých plazmid přežívá a množí se, nějakou selekční výhodu ve srovnání s hostitelskými buňkami, které plazmid nemají. Nejčastěji se používají geny pro rezistenci k antibiotikům. Pro vložení cizí DNA se využívá tzv. klonovací místo (MCS, z angl. multiple cloning site), sekvence obsahující větší počet unikátních míst rozpoznávaných restrikčními endonukleázami, pomocí kterých lze plazmid linearizovat (viz níže). Kromě těchto nezbytných částí mohou

¹ Dostupné online: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/cf/Plasmid_%28english%29.svg, [cit. 2017-12-01]

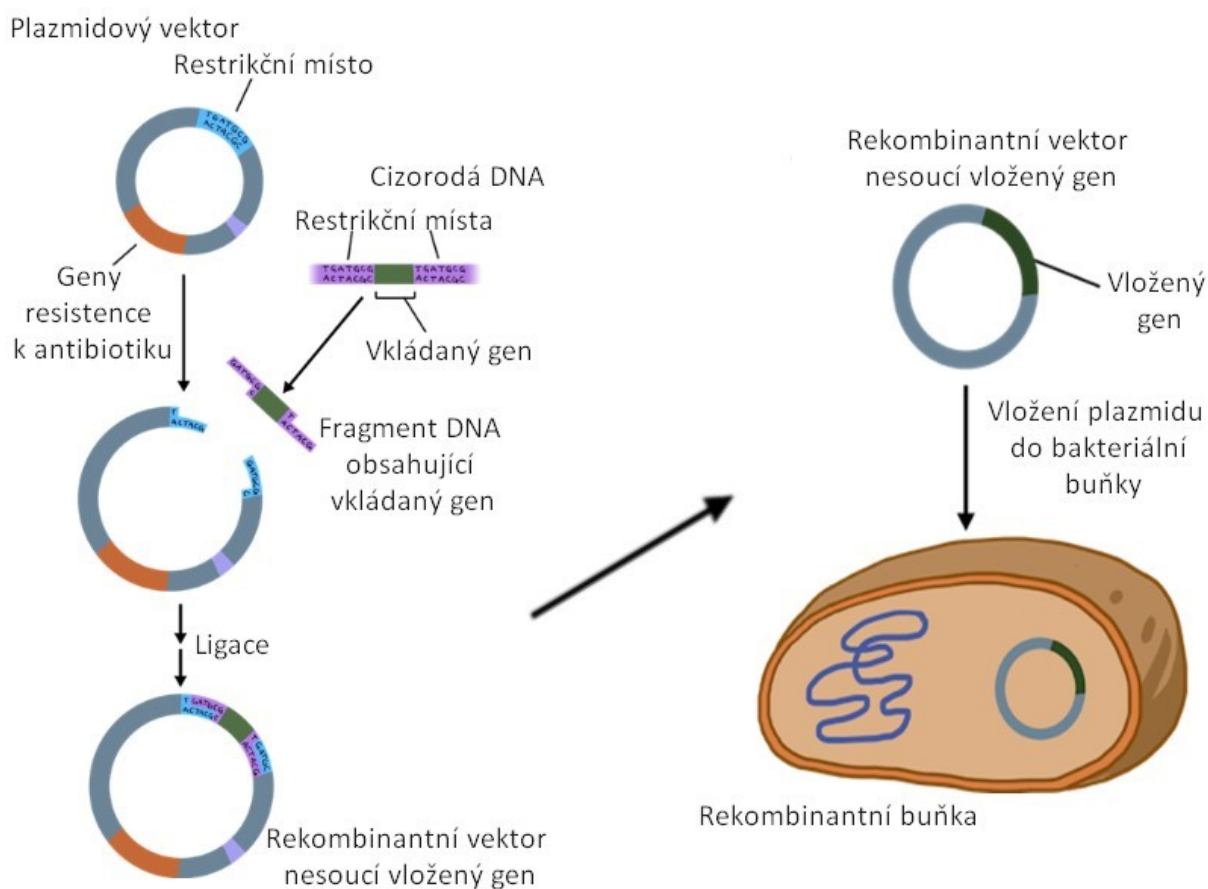
plazmidy obsahovat i geny nutné pro replikaci plazmidu a podílející se na regulaci množství kopií plazmidu v buňce, popř. i detekční geny. Pokud vektory obsahují geny kódující protein, mohou se tyto geny přepisovat a překládat stejně jako geny na chromozómech. Aby k tomu však mohlo dojít, vektor musí obsahovat tzv. promotor, signální sekvenci rozpoznávanou příslušnou RNA polymerázou a umístěnou před genem pro protein, který chceme exprimovat (Brown, 2007).

2.3 Princip klonování DNA

Obecně je pojmem klonování chápáno pořizování identických kopií, klonováním DNA tedy myslíme kopírování fragmentů DNA v hostitelských buňkách. Termín klonování DNA se v genovém inženýrství používá rovněž pro označení procesu technologie rekombinantní DNA (neboli rekombinace *in vitro*), jejímž principem je vložení cizorodé sekvence do plazmidu nebo jiného vektoru, ve kterém lze sekvenci mezi jednotlivými kroky namnožit a vybrat správné meziprodukty ze směsi podařených a nepodařených variant (Štípek, 1997). Rekombinace *in vitro* probíhá v následujících krocích (obr. 2):

1. Izolace plazmidu, který má sloužit jako vektor, z hostitelských buněk a získání cizího fragmentu DNA, který chceme do vektoru klonovat. Štěpení izolovaného vektoru a cizorodého sekvence DNA vhodnou restriční endonukleázou, popř. kombinací dvou restričních endonukleáz (viz níže) (Kodíček, 2004).
2. Spojení (ligace) štěpeného cizorodého fragmentu DNA se stejně štěpeným vektorem pomocí DNA ligázy za vzniku rekombinantního plazmidu.
3. Navrácení rekombinantního plazmidu do hostitelských buněk za účelem jeho pomnožení – klonování. Při každém dělení buňky totiž dojde k replikaci plazmidu a tím i cizího fragmentu DNA (genu) (Kodíček, 2004). Jako hostitelské buňky se často uplatňují bakterie, které lze snadno a levně kultivovat (stačí jim dodávat pouze základní živiny) a rychle se množí (generační doba *Escherichia coli* je za optimálních podmínek 20 minut)². Pro specifické účely lze však využít i buňky kvasinek.
4. Selektce rekombinantních buněk a jejich otestování na přítomnost rekombinantního plazmidu (Kodíček, 2004).

² Měření růstu bakterií. *WikiSkripta* [online]. 2008 [cit. 2017-03-08]. ISSN 18046517. Dostupné online: http://www.wikiskripta.eu/index.php?title=Měření_růstu_bakterií&oldid=365247



Obr. 2: Schéma rekombinace in vitro.³

2.4 Inzerce cizorodé DNA do klonovacího vektoru

2.4.1 Restrikce

Jedněmi ze základních pomůcek využívaných v genovém inženýrství jsou kromě plazmidů i restrikční endonukleázy, neboli restriktázy. Nukleáza obecně je enzym schopný rozštěpit (hydrolyzovat) fosfodiesterovou vazbu nukleových kyselin. Nukleázy lze rozdělit podle substrátu, který štěpí na deoxyribonukleázy (DNázy) štěpící molekulu DNA a ribonukleázy (RNázy) štěpící molekulu RNA. Podle způsobu štěpení lze dále nukleázy rozdělit na exonukleázy a endonukleázy. Zatímco exonukleázy štěpí nukleové kyseliny od konce

³ Dostupné online: <http://www.shmoop.com/biotechnology/dna-technology.html>, [cit. 2017-12-01]

molekuly postupně směrem dovnitř, endonukleázy jsou schopny rozštěpit vazby uvnitř molekuly (Nečas, 2000).

Restrikční endonukleázy se vyznačují tím, že jsou schopny specificky štěpit vlákno DNA v místě, kde se nachází určitý sekvenční motiv, dlouhý obvykle 4-8 bází. Většina restriktáz rozeznává tzv. palindromy, sekvenční motivy charakteristické tím, že se čtou na obou komplementárních řetězcích DNA stejně (Kodíček, 2004). Např. restriktáza Bgl II štěpí v místě AGATCT, Eco RI v místě GAATTC, Hind III v místě AAGCTT a podobně. Existují i nepalindromatické enzymy, kterých je však menšina a pro genové manipulace se využívají jen zřídka⁴, viz obr. 3.

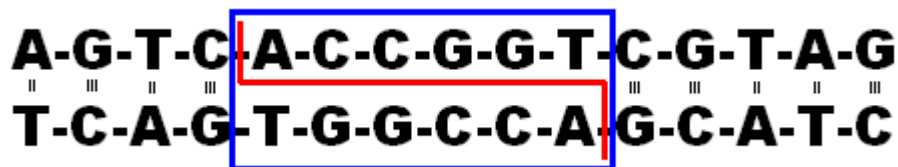
Restriktázy pochází původně z bakterií a v současnosti je jich známo několik tisíc. Jejich biologická funkce je však sporná. Diskutuje se např. o jejich významu při ochraně bakterií před cizorodou DNA (genomy bakteriofágů, cizí plazmidy) (Rédei, 2008). Většina restriktáz se dnes už neizoluje z bakterií, ale vyrábí se průmyslově, právě technologií rekombinantní DNA. Vybraný enzym je možné si objednat komerčně u některé z mnoha specializovaných firem. Každá firma navíc poskytuje pro restrikční endonukleázy systém speciálních pufrů, z nichž lze vytvořit reakční podmínky pro téměř všechny restriktázy (osobní sdělení Mgr. Podolskou, rok 2013).

V technologii rekombinantní DNA se restriktázy využívají primárně ke štěpení vektoru a fragmentu cizorodé DNA umožňujícím spojení obou molekul DNA za vzniku rekombinantního plazmidu. Pro restrikci lze použít enzymy štěpící palindrom:

1. Symetricky a produkující tzv. tupé konce, např. Eco RV štěpí mezi nukleotidy GAT – ATC
2. Asymetricky a produkující tzv. lepidé (kohezní) konce, např. enzym Eco RI štěpí mezi nukleotidy G - AATTC. Pro klonování DNA je důležité vhodně rozštěpit plazmid i cizorodý fragment stejným restrikčním enzymem, popř. stejnou kombinací dvou restrikčních enzymů. Rozštěpený vektor a cizorodý fragment DNA je v následujícím kroku spojen pomocí ligázy⁵.

⁴ Klonování genů a genové inženýrství. *Lékařská fakulta Masarykovy univerzity* [online]. 2008 [cit. 2017-03-08]. Dostupné z webu http://www.med.muni.cz/patfyz/tmbg/Klonov%En%ED_MM.pdf

⁵ Metody analýzy nukleových kyselin. *Vysoká škola chemicko-technologická v Praze* [online]. 2006 [cit. 2013-03-08]. Dostupné z webu <http://www.vscht.cz/kot/resources/studijni-materialy/bc-skripta/kapitola10.pdf>



Obr. 3: Schéma restrikce - palindromní sekvence DNA (modře) a štěpení lepivých konců (červeně).⁶

2.4.2 Ligace

Ligázy jsou, stejně jako restrikční endonukleázy, neodmyslitelnou součástí genového inženýrství. Slovo ligáza pochází z latiny a znamená „*ligāre*“ – spojit nebo slepit dohromady. DNA ligáza je tedy specifický typ enzymu, který usnadňuje spojení řetězců DNA katalýzou tvorby kovalentní fosfodiesterové vazby. V živých organismech se uplatňuje především při opravách DNA zlomů, při replikaci DNA (spojování Okazakiho fragmentů) nebo při crossing-overu (Kodíček, 2004). V molekulární biologii se používá ke spojení DNA molekul, např. vektoru a cizího fragmentu DNA, za tvorby rekombinantní DNA molekuly. V genovém inženýrství se pro většinu experimentů používá T4 DNA ligáza izolovaná z bakteriofága T4, která je nejaktivnější při teplotě 25 °C (Nicholl, 2008).

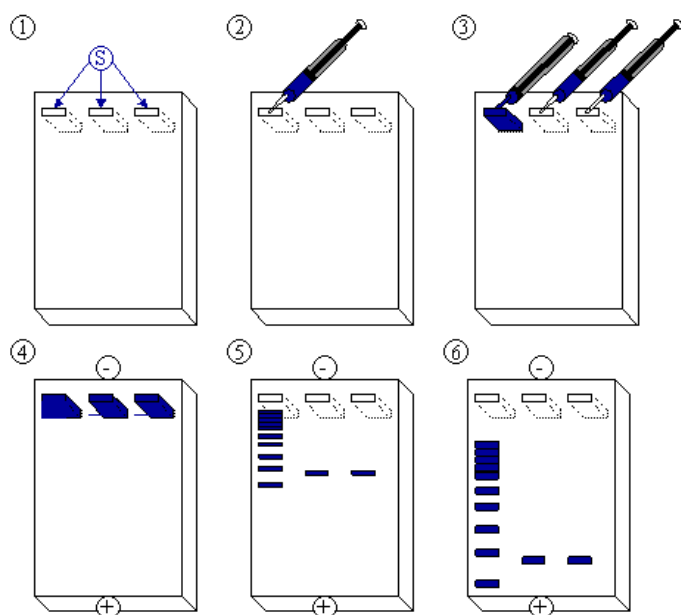
2.4.3 Gelová elektroforéza

Elektroforéza (obr. 5) je separační metoda, jejímž principem je dělení nabitých molekul s odlišnou pohyblivostí ve stejnosměrném elektrickém poli (elektroforetickou mobilitou). Protože molekuly DNA jsou nabitě záporně, putují při elektroforéze ke kladnému pólu. Ačkoli je elektroforetických metod celá řada, k dělení molekul DNA se běžně používá elektroforéza na nosiči, kterým je nejčastěji agarózový gel, méně často gel polyakrylamidový (Kodíček, 2004).

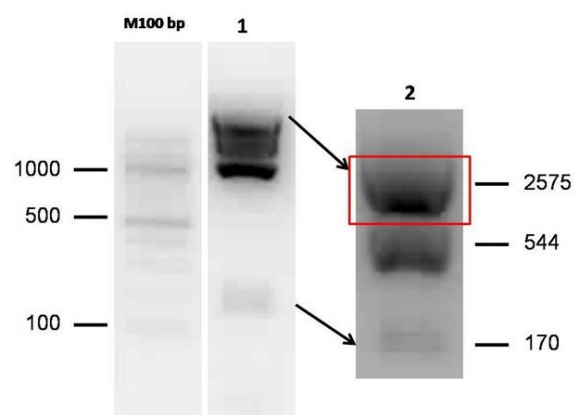
Postup agarózové elektroforézy je následující: Agarózový prášek se nejprve uvaří v pufru, který je taktéž obsažen ve vaně elektroforetické aparatury coby elektrolyt. Gel tvoří mikroskopická síť pórů, jimiž se molekuly pohybují různou rychlostí v závislosti na své velikosti. Menší molekuly se póry pohybují snadněji, a tudíž i rychleji než molekuly větší.

⁶ Dostupné online: <http://www.wikiskripta.eu/images/4/4d/Palindrom.PNG>, [cit. 2017-12-01]

Porozita gelu je udávána jeho hustotou. Vzorky DNA se nanášejí do žlábků na jednom konci gelu vytvořených pomocí tzv. hřebínku, který se umísťuje do aparatury ještě před ztuhnutím gelu. Před samotnou elektroforézou jsou vzorky smíchány s pufrům obsahujícím glycerol (popř. sacharózu) a bromfenolovou modř pro snadnější nanášení vzorků. Pro vyhodnocení elektroforézy je naprosto nezbytná přítomnost standardu molekulových velikostí (tzv. markeru) obsahujícího fragmenty DNA o definované velikosti. Pro vizualizaci separovaných fragmentů DNA se využívají různé značící látky přidávané buď přímo do vzorku DNA nebo do gelu. Jednou z nich je ethydiumbromid, který je schopen interkalovat mezi vlákna dvoušroubovice DNA a fluoreskuje v ultrafialovém světle. Citlivější metodou je začlenění radioaktivně značených nukleotidů do DNA před elektroforézou. Nejčastějším takto používaným prvkem je radioizotop ^{32}P (Bártová, 2011).



Obr. 4(A): Schéma metody elektroforézy.⁷



Obr. 4 (B): Výsledný obraz elektroforézy pod UV zářením. Fragment odpovídající genu pro protein huAgoI zde orámován červeně (vlastní zdroj autorky, 2013).

⁷ Dostupné online: <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/1/11/Agarose-Gelelektrophorese.png>, [cit. 2017-12-01]

2.5 Vnesení rekombinovaného vektoru do hostitelské buňky

2.5.1 *E. coli* a její využití v GI

Escherichia coli je gramnegativní fakultativně anaerobní bakterie. Jedná se o nesporotvornou tyčinku, která se pohybuje pomocí bičíků a na svém povrchu má dva typy fimbrií. Tato tyčinkovitá bakterie je přirozeným komenzálem tlustého i tenkého střeva teplokrevných živočichů, včetně člověka (Lee, 2009).

Escherichia coli se stala středem zájmu biologů a přispěla k poznání životně důležitých procesů, jako je replikace DNA či dekódování genetické informace. Díky své poměrně snadné kultivaci na jednoduché směsi živin (jsou schopny žít pouze na glukóze jako zdroji uhlíku, energie a soli), odolnosti vůči různým chemickým podmínkám a rychlému množení (při teplotě 37° C se dělí každých 20-25 minut), se *E. coli* často využívá coby modelový experimentální organismus. Pro klonování se nejčastěji využívají uměle upravené kmeny *E. coli*, které nemají schopnost syntézy restričních endonukleáz (Ruml & kol., 2002).

Escherichia coli je mimo jiné jedním z organismů využívaných k expresi rekombinantních proteinů, čili procesu, při kterém dochází pomocí expresních systémů k vytvoření bílkoviny odvozené od určité části nebo celého genu. Pro expresi je nutná přítomnost tzv. expresního vektoru obsahujícího úsek DNA, který odpovídá genu kódující protein, který chceme exprimovat. Obsahuje-li vektor tzv. promotor, lze gen pro protein přepisovat a překládat stejně jako geny na chromozómech. Ačkoliv má exprese rekombinantních proteinů v bakterii *E. coli* mnoho výhod souvisejících především s jednoduchostí a rychlostí jejího množení, tzn. vysoký výtěžek proteinu v relativně krátkém čase, skýtá i mnoho úskalí. Mezi těmito můžeme zmínit např. častou nerozpustnost exprimované bílkoviny komplikující její purifikaci z buněk nebo jiné či neúplné posttranslační úpravy získaných proteinů (Štípek, 1997)

Pomocí *E. coli* expresního systému se v minulosti podařilo průmyslově vyrobit několik významných proteinů. Jedním z nich je např. hormon inzulin, získaný v roce 1982 a vyrobený za účelem léčby diabetu. Dalším důležitým proteinem využitelným v oblasti zdravotnictví je růstový hormon, podporující přesun aminokyselin do buněk a jejich

zabudování do proteinů. Tento hormon podporuje játra a ledviny a působí na růst kostí do délky. V neposlední řadě zmíním také vakcínu proti lymské borelióze, infekčnímu onemocnění způsobenému bakteriemi rodu *Borrelia*. V tomto případě je vakcína účinná pouze na bakterii druhu *Borrelia burgdorferi* (Drobník, 2008).

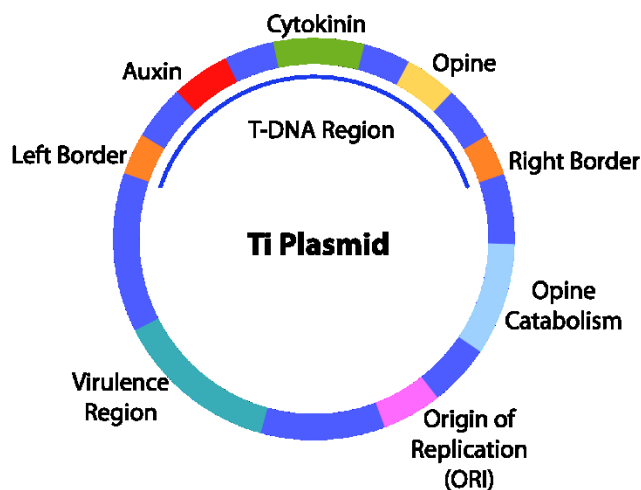
2.5.1 Agrobacterium tumefaciens a její využití při tvorbě geneticky modifikovaných rostlin

Jedná se o půdní gramnegativní bakterii, jejíž schopností je vyvolávat růst nádorů v rostlinných pletivech dvouděložných rostlin. Podstatou této schopnosti je přenos části genetické informace bakterie, která obsahuje sadu genů pro produkci rostlinných hormonů – auxinů a cytokininů, které vyvolávají proliferaci rostlinných buněk a růst nádoru a také sadu genů pro tvorbu opinů – což jsou většinou estery některých bazických aminokyselin, které slouží bakterii jako zdroj uhlíku, dusíku a energie. Jedná se o čistě parazitickou bakterii, jejíž působení nepřináší hostiteli žádný profit (Ondřej & Drobník, 2002).

Již Aristoteles popsal rostlinné nádory, avšak prokázání, že některé z nich způsobují bakterie, proběhlo až na počátku 20. století. Dlouhou dobu panovalo podezření, že bakterie *A. tumefaciens* mění buňky geneticky, avšak metody, které by toto přesvědčení potvrdily, ještě neexistovaly (Ondřej & Drobník, 2002). V roce 1974 Jeff Schell objevil plazmid uvnitř bakterie. Teprve v roce 1978 (Šifner & kol., 1998) bylo přítomností charakteristických nádorových specifických látek (opinů) v nediferenciovaných pletivech podmíněných *A. tumefaciens* dokázáno, že bakterie vnáší do rostlinných buněk svůj plazmid, který se včleňuje do DNA rostliny (Ondřej & Drobník, 2002). Tento vektor, jenž nese specifické geny, byl nazván Ti plazmid (Tumor inducing) a ona část cizorodé genetické informace vnášená do rostlinných buněk, byla nazvána T-DNA (transferred DNA – přenášená DNA) (Šifner & kol., 1998). Ti plazmid představuje zhruba 3 % délky chromozomu této bakterie, tedy má velikost v rozmezí 150–200 kb, samotná délka přenášené T-DNA činí asi 15 kb (Ondřej & Drobník, 2002).

Aby mohlo docházet k tvorbě nádorů, musí Ti plazmid obsahovat dva důležité úseky: T-DNA a úsek virulence. Zatímco část T-DNA umí vstoupit do buněk, úsek virulence zajišťuje její integraci do rostlinného genomu. Sektor virulence odpovídá velikosti asi 35 kb,

je téměř shodný u rozličných typů Ti-plazmidů a na mapách plazmidů bývá lokalizován vlevo od T-DNA (Ondřej & Drobník, 2002).



Obr. 5: Struktura Ti-plazmidu⁸

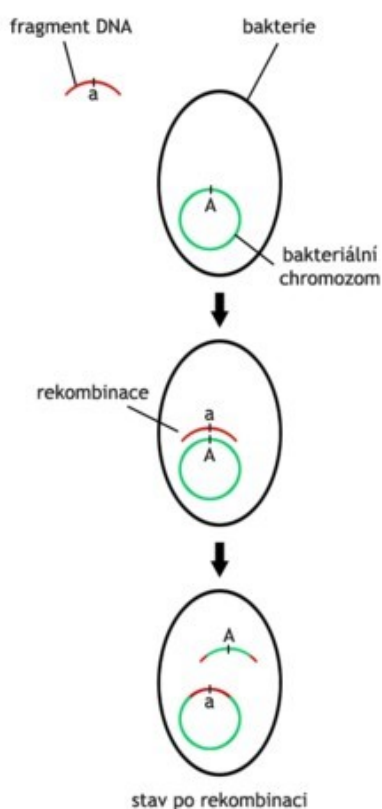
Brzy se přišlo na technologie, kterými lze nahradit původní geny T-DNA a využívat *A.tumefaciens* jako vektor. Přenos je výhodný hlavně pro svou univerzálnost, neboť přenášené geny mohou pocházet z bakterií, virů či živočichů, anebo mohou být dokonce uměle vytvořeny. Bakterie jsou však schopny vnášet svou DNA do rostlin v různé intenzitě, což může vést k malé účinnosti u některých dvouděložných a většiny jednoděložných rostlin. Přenos cizích genů do rostlinných buněk znamenal zlom, neboť bylo možné přenášet geny pro rezistenci vůči chorobám (např. tabáková mozaika), škůdcům (mandelinka bramborová, makadločka bavlníková a jiné), ale také abiotickým faktorům (zasolení půdy, chlad, atd.) (Šifner & kol., 1998).

2.5.2 Transformace

Přenos cizorodé molekuly DNA do bakterie nazýváme transformací. Její podstatou je zachycení malých fragmentů DNA přímo z okolního prostředí a jejich přenos do bakterie. Bakterie mají na svém povrchu nejen cytoplazmatickou membránu, ale také buněčnou stěnu. Při vpravování genu do bakterie jsou tedy překonávány hned dvě bariéry. K úspěšné transformaci je zapotřebí speciálních buněk, které jsou pro transformaci tzv. kompetentní.

⁸ Dostupné online: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/d/d1/Ti_plasmid.svg, [cit. 2017-12-01]

Kompetentní buňky jsou schopny přijmout a uchovat určitý plazmid. Kompetentní buňky lze připravit i v laboratoři, a to technikami umožňujícími vytvořit prostupnou buněčnou stěnu. Tyto techniky se liší podle metody, jakou chceme bakterie transformovat (Alberts & kol., 1998).



Obr. 6: Schéma transformace⁹

V běžných přírodních podmínkách pochází DNA z rozbitých či mrtvých bakterií. Přijímaná DNA nemusí být ale výhradně bakteriální, fakticky může být jakákoliv. Tohoto jevu se využívá především v genovém inženýrství. Nevýhodou transformace je vystavení DNA vlivům extracelulárního prostředí. Zde se vyskytují nukleázy a další látky, které mohou DNA výrazně poškodit. Výhoda spočívá v možnosti množení plazmidové DNA obsahující gen zájmu v bakteriích a jeho následného studia v laboratorních podmínkách (Alberts & kol., 1998).

⁹ Dostupné online: http://www.wikiskripta.eu/images/7/7c/Transformace_%28mikrobiologie%29.png, [cit. 2017-12-01]

Metodu transformace bakterií lze provést i v laboratorních podmínkách. Existuje několik různých způsobů, jak přinutit kompetentní buňky přijmout cizorodou DNA. Všechny metody spočívají v krátkodobé destabilizaci cytoplazmatické membrány bakterie a vytvoření pórů umožňujících vnesení cizorodé DNA do buňky. Toho lze dosáhnout např. metodou teplotního šoku (tzv. „heat shock“). Při této metodě jsou buňky na krátký okamžik vystaveny teplotnímu šoku, přenesením z ledu na cca 42 °C po dobu maximálně jedné minuty. Další velmi oblíbenou metodou transformace je tzv. elektroporace. Při této metodě jsou buňky na krátký okamžik vystaveny elektrickému šoku. Díky tomu dojde na krátký okamžik k depolarizaci buněčné membrány, což umožní vniknutí cizí DNA (Nicholl, 2008).

Účinnost transformace není příliš vysoká a závisí na použitém kmeni bakterií, pracovním postupu, či koncentraci DNA. Bakterie, které byly transformovány, je výhodné kultivovat v podmínkách, které zvýhodňují udržování a množení plazmidu. Po pomnožení bakterií lze izolací DNA získat z bakterií zpět mnohonásobné množství kopií plazmidu s vloženou molekulou cizí DNA (odtud se vzal termín „klonování DNA“). Pro izolaci se většinou používají firemní soupravy (kity), založené na adsorpci DNA na silikátový povrch. Podmínky izolace jsou upraveny tak, že získáme selektivně malé molekuly DNA (tedy plazmid), zatímco vysokomolekulární bakteriální chromozóm se během izolace ztrácí (osobní sdělení Mgr. Podolskou, rok 2013).

2.5.3 Transfekce

Transfekce je další nevirovou metodou užívanou k vnesení cizorodé nukleové kyseliny (DNA, RNA), tentokrát do eukaryotních buněk. Při transfekci jde tedy o překonání pouze jedné bariéry, kterou je cytoplazmatická membrána. Metody transfekce lze dělit na biochemické a fyzikální. Protože nukleové kyseliny nesou negativní náboj, nejsou schopny procházet lipidovými membránami, neboť i ty jsou rovněž záporně nabitě. Podstatou biochemických metod je zabalení nukleových kyselin do váčků umožňujících projít přes cytoplazmatickou membránu, popř. neutralizace nukleových kyselin či přidělení kladného náboje. Jedním ze způsobů biochemické transfekce je lipofekce. Při této metodě je DNA obalena umělými liposomy, které umožňují průchod lipidovou membránou. Mezi metody fyzikální patří např. mikroinjekce, kterou je vnášena DNA nejčastěji

do embryonálních kmenových buněk. Dalším typem transfekce může být podobně jako u bakterií elektroporace nebo teplotní šok (Luo & Saltzman, 2000).

2.6 Selektce kolonií nesoucích rekombinantní vektor

Spojování cizorodého fragmentu DNA s vektorem technologií rekombinantní DNA má jeden zásadní problém. Ligaci se totiž nemusí vždy spojit přesně jedna molekula cizorodé DNA s linearizovaným („prázdným“) vektorem, ale velice často dochází k opětovnému uzavření prázdného vektoru bez včlenění cizí DNA molekuly, nebo se cizí molekuly DNA mohou spojovat samy se sebou. Pro zvýšení účinnosti ligace cizorodé DNA s vektorem je v některých případech výhodné upravit vektor tzv. defosforylací, při níž je z molekuly DNA enzymaticky (např. pomocí fosfatázy SAP z angl. „Shrimp Alkaline Phosphatase“) odstraněna fosfátová skupina. Tím se sníží pravděpodobnost, že se při ligaci spojí dohromady opět konce prázdného vektoru (Brown, 2007).

Po transformaci je nutné kompetentní bakteriální buňky vysít na pevnou kultivační půdu (agar) a kultivovat je při 37 °C. V Petriho misce nám nejčastěji do 24 hodin vyrostou bakteriální kolonie, z nichž každá původně vznikla z jediné buňky. Pokud při kultivaci použijeme vhodné selekční podmínky, které zvýhodňují udržování a množení plazmidu, vyrostou pouze kolonie, jejichž buňky obsahují plazmid, nicméně nehledě na to, jestli je rekombinantní, nebo prázdný. Pro selekci transformovaných bakterií se nejčastěji používá médium obsahující antibiotikum (např. ampicilin nebo kanamycin), na které jsou bakterie nesoucí danou plazmidovou DNA rezistentní (osobní sdělení Mgr. Podolskou, rok 2013).

K odlišení kolonií, které obsahují nejen plazmid, ale i cizí molekulu DNA uvnitř plazmidu, se u geneticky upravených plazmidů používají tzv. reportérové geny. Jedním z takových genů je gen pro alfa-peptid enzymu β -galaktozidázy, který při kultivaci na speciálním médiu zajišťuje tzv. modro-bílou selekci. Tento enzym štěpí galaktózu na laktózu a glukózu. Díky tomuto enzymu kolonie, nesoucí jen „prázdný“ plazmid, zmodrají, zatímco rekombinantní kolonie zůstanou krémově bílé (obr. 6) (Sambrook & Russell, 2001). Další metodou, která je jedna z nejspolehlivějších a je použitelná téměř ve všech případech, je odlišení rekombinantních kolonií restrikční analýzou. Z narostlých kolonií lze totiž izolovat plazmidovou DNA, která se dá rozštěpit určitou restrikční endonukleázou nebo kombinací několika restrikčních endonukláz. Výsledek pak odečteme z restrikčního vzorce, který se

bude lišit v závislosti na tom, zda plazmidová DNA obsahuje nebo neobsahuje vložený úsek cizorodé DNA navíc. Třetí často využívanou metodou je tzv. polymerázová řetězová reakce, zkráceně PCR (z angl. „polymerase chain reaction“). Pomocí této metody lze amplifikovat určitý úsek DNA analyzovaného genu, aniž by jej bylo nutné nejprve klonovat ve vektorech (Sambrook & Russell, 2001).



Obr. 7: Ukázka Petriho misky s bílými a modrými bakteriálními koloniemi¹⁰

2.7 Rezistence bakterií k antibiotikům a s tím spojené problémy v terapii bakteriálních onemocnění

Ačkoli rezistence bakterií k antibiotikům se s výhodou využívá v genovém inženýrství, v terapii bakteriálních onemocnění je obrovským problémem. Antibiotika jsou látky, které přirozeně vyrábí některé mikroorganismy, někdy i vyšší rostliny, či živočichové. Tyto látky jsou schopny potlačit růst jiných organismů. K výraznému rozvoji antibiotik jako účinných léků došlo až po Flemingovu nález penicilínu (Votava, 2001). S přibývajícími roky se však začala vlivem evoluce bakteriálního genomu a selekčního tlaku prostředí vytvářet

¹⁰ Dostupné online: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/c5/Blue-white_test.jpg, [cit. 2017-12-01]

sekundární, či také získaná rezistence. Bakterie jsou velmi geneticky proměnlivé a schopné vyvíjet obranné mechanismy během neobyčejně krátké doby (Špízek, 1999).

Daná bakterie může k rezistenci přijít různými způsoby. Jedná se především o přenos genů, zajišťujících rezistenci pomocí plazmidů, transpozónů a genových kazet. Druhým způsobem je mutace. Mutace vzniká odstraněním části genu, náhradou genu, či přidáním jednoho nebo i více párů bází DNA. Tím je ovlivněna peptidová struktura a omezena schopnost vázat antibiotikum (Špízek, 1999).

Tyto změny předávají bakterii nové vlastnosti. Může docházet k: (I.) změně průchodnosti buněčných obalů, (II.) produkci enzymů, která antibiotika zneškodní, (III.) aktivnímu vypuzování antibiotik z bakteriální buňky nebo (IV.) ke změně zásahového místa (Votava, 2001).

Antibiotika jsou často vnímána coby „všemocný lék“. Nadměrné předepisování a užívání antibiotik je však obrovským rizikem. Jejich používání na virová onemocnění, proti kterým jsou neúčinná, či preventivně například u chovu zvířat, zvyšuje možnosti přenosu rezistence mezi bakteriemi. Tím se přirozeně zvyšuje počet odolných bakterií, které tvoří nové, odolné generace. Rizikem je také předepisování nesprávných druhů antibiotik, či jejich chybné používání, nedodržování intervalů, nebo nedobírání předepsaných dávek (Špízek, 1999). Tyto faktory výrazně ztěžují léčbu. Lékaři jsou nuceni nahrazovat stávající antibiotika jinými, dražšími druhy, nebo je kombinovat, čímž dochází k zvyšování jejich cytotoxicity.

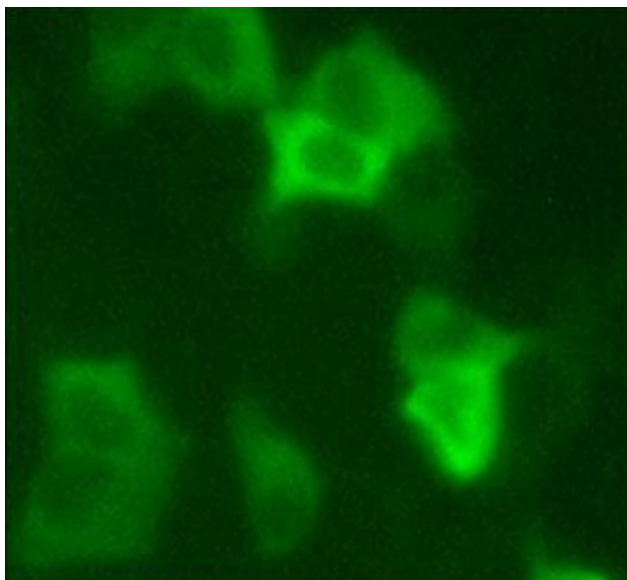
2.8 Fluorescenční mikroskopie a využití zeleného fluorescenčního proteinu (GFP) v genovém inženýrství

Fluorescenční mikroskop je v mnohém velmi podobný klasickému světelnému mikroskopu, je ovšem doplněn o silný zdroj světla a většinou také o dva typy filtrů. Prvním z nich je filtr excitační, který dovoluje vybuzení jednotlivých fluoroforů světlem o určitých vlnových délkách. Tím zabraňuje průchodu světla o stejné či podobné vlnové délce jako světlo emisní, které by vytvářelo pozadí. Nachází se mezi zdrojem světla a vzorkem. Druhým typem je bariérový, nebo také emisní filtr. Díky němu je zvýšena citlivost, neboť propouští pouze světlo emisní (Soukup, 2004).

Určité látky, nazývané také fluorofory, po ozáření světlem mohou absorbovat světlo určité vlnové délky a posléze emitovat světlo o delší vlnové délce – tedy světlo jiné barvy. Tento jev nazýváme fluorescencí a jedná se o projev intramolekulové energetické změny vzbuzené v látce absorbovaným zářením. Světlo kratší vlnové délky má více energie, po dopadu se tedy zvětšuje energie samotné molekuly. Určitá část energie je ovšem molekulou pohlcena a při vyzařování má světlo tím pádem menší energii. Tohoto jevu se v praxi využívá především v mikroskopii. Na prvky sledovaného vzorku se chemicky naváže nebo absorbuje látka, která má schopnost fluorescence. Po ozáření světlem o určité vlnové délce se „rozsvítí“ dané struktury nebo proteiny v preparátu. Tím můžeme specificky označit molekuly v tkáni (bílkoviny, lipidy,...), zviditelnit některé buněčné struktury (jádro, cytoskelet) či nalézat určité sekvence nukleotidů v DNA nebo RNA. Látky, které se používají ke zviditelnění molekul, které nemají autofluorescenci, se označují jako fluorescenční barviva (Soukup, 2004).

Revolučním objevem ve fluorescenční mikroskopii živých buněk se stal zelený fluorescenční protein (GFP z angl. Green fluorescent protein), (obr. 8). Díky němu se totiž dají buněčné struktury sledovat u živých buněk. GFP byl poprvé izolován z medúzy *Aequorea victoria*. GFP je složen z 238 aminokyselin, přičemž tři z nich spontánní reakcí za přítomnosti kyslíku vytváří fluorescenční chromofor. Zvláštností této látky je fluorescence zelené barvy, pokud je vystavena modrému světlu. Využití přináší především jako reportérový protein. Metodou klonování DNA lze totiž gen pro protein GFP fúzovat s genem pro protein, který chceme studovat (označme si ho např. protein X). Po expresi v hostitelských buňkách se pak vytvoří fúzní protein GFP-X ve kterém protein GFP slouží jako reportér, značka, která nám dovolí sledovat „on-line“, co se se studovaným proteinem X v buňce děje. S využitím metod genového inženýrství již bylo vytvořeno i mnoho geneticky modifikovaných organismů exprimujících protein GFP. Mezi ně patří různé druhy bakterií, hub, ryby (např. zabříčka), rostliny, mouchy (*Drosophila*), ale i savci. Za objev a vývoj GFP dostali v roce 2008 Nobelovu cenu za chemii páni Martin Chalfie, Osamu Shimomura a Roger Y. Tsien (Černý, 2009).

Cílenou mutagenezí bylo umožněno vytvořit několik odstínů odvozených od GFP, tedy například jeho žlutá (YFP) a modrozelená (CFP a BFP) varianta. Dalším, ovšem již nepříbuzným, používaným proteinem je červený fluorescenční protein (RFP) (Černý, 2009).



Obr. 8: Ověření produkce fúzního proteinu EGFP-huAgoI v živých HeLA buňkách, vyfoceno invertovaným mikroskopem (vlastní zdroj autorky, 2013).

3 Praktické využití plazmidů

Využíváním metod genového inženýrství lze dosáhnout zrychlení, zdokonalení, ale také zjednodušení dosavadních procesů. Molekuly DNA tvořené rekombinací lze především využít k produkci nejrůznějších látek v hostitelské buňce, ať už se jedná o výrobu léčiv (inzulín, růstový hormon, různé protilátky), bioindikátory (enzymy do pracích prášků) nebo výroba základních prvků pro konstrukci nových materiálů (Vondrejs, 2010).

3.1 Produkce farmakologicky významných proteinů

Metody genového inženýrství umožňují pozměnit genomovou úlohu buněk. *In vitro* ("ve skle") je potom možné produkovat velké množství proteinu biotechnologickou cestou. Aby však bylo možné tuto syntézu provádět, musí být splněny určité podmínky pro expresi genu a produkci výsledné látky. Tímto způsobem je poté dokonce možné syntetizovat savčí protein v bakteriálních buňkách (např. inzulin v bakterii *E. Coli*), (Štípek, 1997).

První podmínka stanovuje, že vektor musí být zkonstruován tak, aby byl gen správně začleněn v rámci čtení genetického kódu. Druhá podmínka se vztahuje k vložení výkonného promotoru (sekvence DNA, na kterou se váže RNA polymeráza či jiné části transkripčního zařízení), který vede k rychlému zahájení transkripce. Je vhodné vložit před samotný gen blízko před iniciační kodon sekvenci jako vazebné místo, na něž se váže mRNA na ribosom. Gen by měl být začleněn do vektoru v podobě cDNA, aby nedošlo k jeho přerušování introny jako u původního genu. Tím je vyřešen problém neschopnosti bakterie vystříhat části eukaryotické pre-mRNA (Štípek, 1997). Proces začleňování cizorodé DNA do bakteriálního genomu nazýváme transformací (Šifner & kol., 1998).

Tento problém odpadá, je-li cizorodá DNA vnášena do eukaryotní hostitelské buňky, která zmíněné mechanismy pro posttranskripční a posttranslační úpravy látky obsahuje. Příkladem může být vnesení krysího genu pro růstový hormon, který byl zaváděn do myších germinálních (multipotentních kmenových) buněk. Tyto myši následně vyrostly na dvojnásobnou velikost. Vnášením exogenní DNA do eukaryotních buněk vznikají tzv. transgenní zvířata. Vložením cizorodé DNA do rostlinných buněk vznikají tzv. transgenní rostliny. Tyto rostliny, odolné vůči škůdcům, s vyššími nutričními hodnotami a dalšími výhodnými vlastnostmi (jak pro člověka, tak pro daný organismus), jsou

předmětem mnoha diskuzí, zabývajících se klady (ceněný zdroj potravin) i záporů (vznik superplevelů) využití těchto technologií (Štípek, 1997).

3.1.1 Inzulin

Jednou z možností, jak v genovém inženýrství využít plazmidy pro produkci látek, je syntéza inzulinu. Inzulin, hormon produkovaný beta-buňkami Langerhansových ostrůvků slinivky břišní, snižuje hladinu cukru v krvi a je tedy nezbytně nutný pro lidský život. Pokud dochází k nedostatečné tvorbě inzulinu přirozenou cestou v lidském těle, dochází k Diabetu mellitus, onemocnění známému též jako cukrovka (Ganong, 1995).

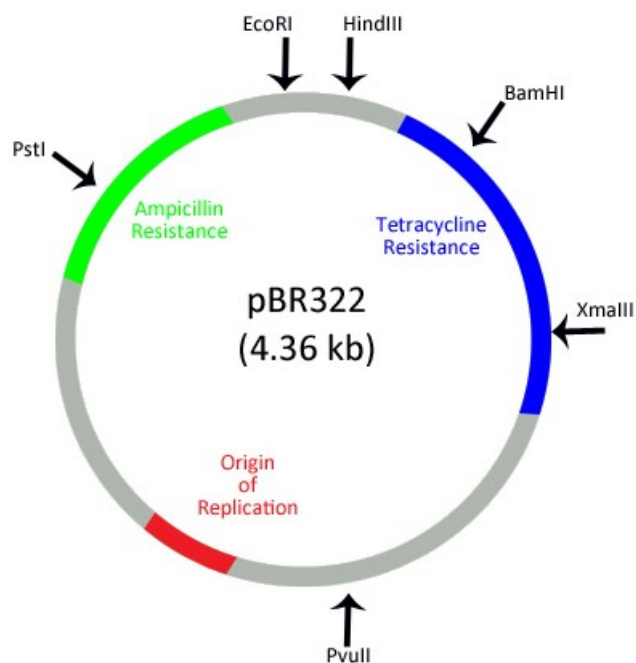
Onemocnění se léčí dodáním uměle vytvořeného inzulinu do pacientova těla. Dříve se zmiňovaný hormon izoloval z pankreatů vepřů nebo skotu. Získávání probíhalo především u jatečního skotu a vepřů, kterým byla po porážce vyňata slinivka břišní a z ní byl dále izolován, čištěn a zpracováván zvířecí inzulin. Vepřový inzulin se však složením od humánního liší v jedné z jeden a padesáti aminokyselin, hovězí dokonce ve třech. Tento rozdíl má jen minimální vliv na fungování hormonu v lidském organismu, avšak i přesto docházelo u citlivějších pacientů k nechtěným reakcím. Původním řešením tohoto problému byla záměna jedné odlišné aminokyseliny vepřového hormonu za aminokyselinu obsaženou v lidském inzulinu. Tato semisyntetická metoda byla později nahrazena metodou biosyntetickou, při které se inzulin získává z bakterií nebo kvasinek (Ganong, 1995).

Dle historie je syntéza inzulinu pomocí genového inženýrství počátkem moderních průmyslových biotechnologií. Již v listopadu 1972 se Herbert W. Boyer (University of California-San Francisco) a Stanley N. Cohen (Stanford University) na konferenci o bakteriálních plazmidech na Havaji (Vondrejs, 2010). dohodli na projektu, podle něhož zkonstruují rekombinantní DNA pomocí Bayerových restriktáz, které umožní vložit exogenní DNA do Cohenova plazmidu, jenž ji vnese do bakteriální buňky (Drobník, 2008).

Zdařilý pokus demonstrovali na vložení žabí ribosomální DNA do bakterie *E. Coli*, která dle očekávání produkovala odpovídající RNA. Po předložení výsledků došlo k obrácení pozornosti na praktické využití rekombinantní DNA, avšak také ke vzbuzení obav z rizik a zneužitelnosti plynoucích z využití těchto technologií – především z úniku bakterie *E. Coli* s přeneseným genem do přirozeného prostředí – lidského zažívacího ústrojí. Zmiňované obavy pramenily ze schopnosti bakterie předávat gen dalším bakteriím (Drobník, 2008).

Pro posouzení rizik byla založena jedenáctičlenná komise v čele s Paulem Bergem, v té době nejznalejším biologem v pokusech přenášet geny, třebaže ne s využitím plazmidů a restriktáz, ale virovou DNA. Berg prováděl pokusy s přenosem DNA z viru SV40 (*Rhesus sarcoma virus* – opičí virus z rodu Polyomavirus), který chtěl zavádět do bakterie *E. Coli*. Došlo však k pozastavení projektu, neboť autoři si uvědomili riziko plynoucí ze zavádění karcinogenního viru do bakterie běžně obývající střevní trakt (Vondrejs, 2010). Třebaže se obavy ukázaly jako neopodstatněné, hrozilo, že by se virem nakažené bakterie dostaly mezi pracovníky laboratoře a rakovina se potom šířila stejně lehce jako například chřipka (Šifner & kol., 1998). Tato skupina tedy apelovala na nepředvídatelnost horizontálních přenosů genů mezi bakteriemi a zákaz konstruovat autonomně se replikující plazmidy, které by mohly přenášet rezistenci k antibiotikům či vést bakterii k tvorbě toxinů. Dopis, zveřejněný 26. července 1974 v časopise Science a známý také jako „Bergův dopis“, dále prohlašoval, že není vhodné vnášet do těchto plazmidů DNA onkogenních virů. Tento dopis nakonec vedl ke konferenci v kalifornském Asilomaru a následnému vydání směrnic NIH (Ústav národního zdraví, USA), který položil základ zákonům o nakládání s geneticky modifikovanými organismy v jiných zemích, mimo jiné i v České republice (Drobník, 2008).

24. května 1976 v Indianopolis byl firmou Eli Lilly & Co přednesen projekt, který měl za cíl vytvořit humánní hormon inzulin pomocí genového inženýrství tak, aby složením přesně odpovídal hormonu přirozeně tvořenému v lidském pankreatu. Realizace předloženého návrhu se zhostily tři skupiny - z Harvardovy university tým Waltera Gilberta, z Kalifornské univerzity v San Francisku (UCSF) skupina Herberta Boyera, se kterou spolupracoval Arthur Riggs z City of Hope (později firma Genentech) a tým Williama Ruttera a Howarda Goodmana (Drobník, 2010).



Obr. 9: plazmid pBR322 z *E. Coli*¹¹

Boyerova kalifornská skupina v San Francisku věnovala velkou pozornost kvalitě vektoru pro přenesení cizorodé DNA, tedy plazmidu. Dva posdoci (absolventi doktoranského studia, kteří ještě nejsou přijati k trvalému stavu) – F. Bolivar a R. L. Rodriguez, vymysleli a následně sestrojili velmi výkonný plazmid, nazvaný pBR322. Boyer v roce 1976 zažádal o schválení tohoto nového plazmidu ředitele NIH, což se podařilo (Drobník, 2008).

Axel Ullrich, pracující ve skupině kolem Goodman a Ruttera, získal mRNA kódující potkaní inzulin, z něž syntetizoval odpovídající DNA – potkaní gen, který vložil do schváleného plazmidu pBR322 a ten byl následně přenesen do *E. Coli*. Experiment se zdařil, neboť sekvencováním (stanovením pořadí nukleových kyselin), byla ověřena přítomnost potkaního genu v bakteriální DNA. V únoru 1977 byl poprvé přenesen savčí gen do bakteriální buňky. Konec tohoto vydařeného pokusu přišel s oznámením, že plazmid pBR322 je sice schválen, nikoli však certifikován. Klonování genů pomocí tohoto plazmidu

¹¹ Dostupné online:

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/en/6/6c/PBR322_plasmid_showing_restriction_sites_and_resistance_genes.jpg, [cit. 2017-12-01]

bylo tudíž ilegální. Kvůli značnému morálnímu tlaku a kritice veřejnosti byli Goodman, Ritter a Ullrich nuceni projekt ukončit a klony zničit (Drobník, 2008).

Projekt na Harvardské univerzitě byl zdržen požadavkem bezpečnostního výboru, aby každý člen laboratoře prošel lékařskou prohlídkou, včetně EKG či EEG, práce tedy začaly až v roce 1978. Walter Gilbert a jeho tým hodlali syntetizovat lidský inzulin známou cestou (první rekombinantní DNA podle Bergera, 1972). Dle klasického postupu by byla izolována přenašečová mRNA pro inzulin z β -buněk Langerhansových ostrůvků pankreatu. Tato sekvence nese kód pro peptidy inzulinu. Následnou reverzní transkripcí by byla vytvořena inzulinová cDNA odpovídající lidskému hormonu, která by se pomocí Boyerových restriktáz vpravila do Cohenova bakteriálního plazmidu a byla umístěna do bakterie *E. Coli*. Pokus Lidie Villi-Komaroff, na který použila již legálně povolený plazmid pBR322, slavil úspěch, neboť byla schopna získat bílkovinu, která obsahovala penicilinázu a potkaní inzulin. Tím potvrdila, nejenže je možné vložit inzulinový gen do vektoru, ale také že příslušná bílkovina opravdu vzniká (Drobník, 2008).

Následoval poslední krok, tedy vložit lidský gen místo potkaního, a syntetizovat humánní inzulin. To se však ukázalo jako problém, neboť práce s lidskými geny byly povoleny pouze v laboratořích s nejvyšším stupněm zabezpečení (P4). V USA však zmíněnou laboratoř vlastnila pouze armáda ve Fort Detricku k výzkumu biologických zbraní a ta odmítla poskytnout své prostory civilním vědcům. Pomocnou ruku však nabídla armáda britská a ředitel Vojenského mikrobiologického zařízení Robert Harris souhlasil s využitím laboratoře v Portonu na čtyři týdny pro Gilbertovu skupinu. Pokus probíhal dle předem připravených plánů, avšak sekvencováním bakteriálního DNA bylo zjištěno, že vlivem nevhodné manipulace byl materiál kontaminovaný předešlými zkušebními pokusy s potkany a gen sice odpovídal inzulinu, avšak potkanímu (Drobník, 2008).

Mezitím firma Genentech – dříve kalifornská skupina, pokračovala ve výzkumech, avšak obešla omezení v podobě P4 laboratoří tím, že Japonec Keiichi Itakura byl schopen připravit perfektní řetězec DNA, který David Goeddel sestrojil jako identický s lidským genem pro inzulin. Z byrokratického hlediska bylo na takto připravenou DNA nahlíženo jako na chemikálii, ačkoliv byla totožná s rekombinantní formou, tudíž nebyla třeba P4 laboratoř.

V srpnu 1978 byli schopni z bakteriální kultury získat asi 20 ng lidského inzulinu (Drobník, 2008).

Musely být splněny podmínky pro expresi umělého genu v hostitelské buňce, poté však bakterie produkovala proinzulin. Tento peptid, z něhož vzniká inzulin, byl tvořen proto, že bakterie nemá enzymy pro postranlační úpravu bílkoviny. Úpravou vhodným enzymem dochází k tvorbě inzulinu. Dnes je výše uvedeným postupem syntetizována většina inzulinu nezbytná k léčbě diabetiků, a to i v České republice (Štípek, 1997).

3.2 Transgenní rostliny

Jak již bylo výše uvedeno, transgenní rostliny vznikají vložením cizorodých genů z jiných, nepříbuzných organismů do jejich DNA. Tento proces u eukaryotických buněk nazýváme transgenozí. Cílenou změnou genetického kódu vznikají tzv. geneticky modifikované organismy (dále jen GMO) nebo geneticky modifikované plodiny (dále jen GMP). Přenos exogenní DNA do rostlinné buňky je umožněn prostřednictvím plazmidů bakterie *Agrobacterium tumefaciens* nebo přímým vnášením do buněk. Druhá jmenovaná forma přenosu (bezvektorová) je nejčastěji biolistická metoda, při níž se gen vysráží na částechkách wolframu či zlata (inertní kovy) a vzniklé projektily jsou „nastřelovány“ do rostlinných buněk. Dojde-li k zasažení jádra, následuje splynutí rostlinného genomu a cizího genu a proběhne transgenoze. Účinnost této metody je však značně nižší, než je tomu u agroinfekce (Ondřej & Drobník, 2002). Objevem transgenoze rostlin došlo tedy k vytvoření nového postupu šlechtění rostlin (Šifner & kol., 1998).

První pokusy konstruovat geneticky modifikovanou rostlinu proběhly ve Francii a v USA v roce 1983, kdy byly zveřejněny publikace o stvoření prvních plodných transgenních rostlinách v laboratoři. V tomto roce byl vytvořen tabák s rezistencí k antibiotiku kanamycinu, za jehož vznikem stojí Michael W. Bevan, Richard B. Flavell a Mary-Dell Chilton. Po použití metody na kultuře obsahující kanamycin vyrostly pouze ty rostliny, které obsahovaly přenášený gen rezistence vůči antibiotiku (Bevan & kol., 1983). V roce 1990 Čínská lidová republika jako první země obchodně využila GMO rostlinu – tabák odolný vůči virům, a také rajče odolné k virům (ISAAA). První geneticky modifikovanou potravinou se stalo v roce 1994 rajče Flavr Savr, vytvořené firmou Calgene Inc.

v kalifornském Davisu. Tato rajčata se mohla sklízet plně zralá, avšak i přesto zůstávala stále čerstvá. Tvrdost plodu je udržována díky pektinu vyskytujícího se v buněčné stěně. Vlivem enzymu polygalakturonázy však dochází k degradaci pektinu v buněčné stěně a plod začne měknout a hnít. Díky genetické modifikaci došlo právě ke snížení tvorby tohoto degradativního enzymu a rajčata si zachovala déle tuhou konzistenci, neměkla, nebyla tím pádem náchylnější k plísňovým onemocněním a bylo možné je sklízet stroji a snáze dopravovat (Custers, 2006).

Nejrozšířenější modifikace:

3.2.1 Transgenoze geny pro toleranci k herbicidům

Realizace plánu vytvořit rostliny odolné k herbicidům (Ht-GMP), byla uskutečněna jako jedna z prvních z řady experimentů s GMP, a to již v roce 1996 v USA, Kanadě a Argentině (Vondrejs, 2010). Herbicidy, jakožto látky používané k likvidaci nežádoucích rostlin (plevelé, invazní rostliny), vyvolávají spory hlavně kvůli svému nebezpečí pro životní prostředí, rizika plynoucí z možné karcinogenity nebezpečné lidem i zvířatům, některé v půdě vydrží jen krátkou dobu a poté se rozkládají, je tedy nutné je použít opakovaně. Běžné plodiny také obvykle vyžadují aplikaci několika herbicidů současně a v častějších intervalech. Nejběžnější systémové tzv. totální herbicidy – glyfosát nebo glufosinát (též fosfinotricin) jsou sice vysoce účinné v boji proti plevelům, avšak společně s nežádoucími rostlinami ničí i ostatní plodiny (Custers, 2006). Bez použití ochrany herbicidů však není možné žádnou kulturní plodinu pěstovat.

Herbicidy obvykle vysoce specificky působí na určitý životně důležitý enzym v rostlinné buňce, který inaktivují, a který většinou není přítomen v živočišných buňkách. Některé z těchto enzymů jsou přítomny v chloroplastech (Šifner & kol., 1998).

Možnosti, jak vyvinout u rostlin rezistenci vůči herbicidům, jsou dvě. V prvním případě je výše zmíněnými metodami vložen transgen, který kóduje enzym, jemuž je v rostlinné buňce potlačena aktivita vlivem herbicidu. Jelikož však enzym kódovaný vloženým transgenem je stavebně nevýrazně odlišný, nepodléhá inhibici herbicidem. Druhou variantou je vložení transgenu, který přináší genetickou informaci o zcela jiném enzymu, který je však schopen rozkládat herbicid (Šifner & kol., 1998).

GMP jsou vždy odolné pouze k jednomu typu herbicidu. Existují dvě hlavní skupiny transgenů podle nejběžněji využívaných herbicidů.

a) Resistance ke glyfosátu

Glyfosát řadíme mezi neselektivní herbicidy, neboť působí na všechny rostliny. Účinkuje postemergentně, tedy ovlivňuje rostoucí zelené rostliny, nikoli počáteční stadia klíčení semen. V současné době je jedním z nejvyužívanějších herbicidů. Z listů se velmi rychle šíří do meristematických zón, plodů, květů a kořenů. Chemicky jde o N-(fosfonomethyl) glycin, řazený mezi terciární aminy. Distribuován je firmou Monsanto pod obchodním názvem Roundup (Cressey, 2015).

Jedná se o specifický inhibitor enzymu 5-enolpyruvylšikimát-3-fosfátsyntázy (zkráceně EPSP). Tento enzym se podílí na biosyntéze aromatických aminokyselin u rostlin, zastavením jeho aktivity tedy dochází k blokaci proteosyntézy a následné záhubě rostliny. Tato enzymatická dráha, známá jako šikimátová dráha, je lokalizována v chloroplastech a přetváří fosfoenolpyruvát a erythrosa-4-fosfát na aromatické aminokyseliny. Název této biosyntetické cesty pochází od kyseliny šikimové, pojmenované podle japonského názvu badyániku (Hluska, 2009).

Glyfosát se aplikuje se v malých dávkách – 0,5-2,0 kg na hektar, známky poškození rostliny jsou postřehnutelné zhruba po 4-7 dnech. Rostlina postupně hnědne, vadne a nakonec hyne. Samozřejmě však existuje různě velká citlivost rostlin vůči glyfosátu, některé rostliny jsou dokonce přirozeně tolerantní, to je zapříčiněno jednak různým pronikáním látky z listů do rostliny, také enzym EPSP může být různě vnímavý k herbicidu, některé rostliny dokáží přeměnit glyfosát na jiné, netoxické látky či se dokáží s herbicidem vyrovnat. Takovou přirozeně odolnou rostlinou je například svlačec. Není však zaznamenaný případ, aby existoval plevel zcela rezistentní ke glyfosátu (Ondřej & Drobník, 2002).

Transgeny, které můžeme využít pro odolnost ke glyfosátu, rozdělujeme následovně:

1. Cizorodé geny, které řídí nadprodukcí EPSP – myšlenka tohoto řešení spočívá v tom, že buňka vyprodukuje tolik molekul EPSP, aby i v případě, že se všechen herbicid naváže, stále zbýval nenavázaný enzym, který může dále pokračovat a pracovat v enzymatických drahách. Výše zmíněné geny byly klonovány z petúnie a lnu, avšak

využití této metody je problematické, neboť takto šlechtěné rostliny měly, nejspíše vlivem ukládání nadbytečného glyfosátu v apikálních pupenech, který ani nadbytek enzymu nestačil vázat, zpomalený růst (Ondřej & Drobník, 2002).

2. Transgeny, které přinášejí rostlině informace o upraveném enzymu EPSP, rezistentnímu vůči glyfosátu – tyto vnesené geny pocházejí z bakterií a jsou označeny jako *aroA*, neboť řídí syntézu aromatických aminokyselin. Pro účely klonování byly použity geny ze *Salmonella typhimurium* (využito u rajčete, modřínu a topolu), *Escherichia coli* (využito u tabáku) a *Agrobacterium sp.*, u které vykazovaly nejvyšší toleranci. Během využívání této metody byla použita řada mutací in vitro, které vedly ke zvýšení tolerance ke glyfosátu (Ondřej & Drobník, 2002).
3. Exogenní geny kódující enzym, který dokáže glyfosát degradovat. Tyto metabolické geny můžeme nalézt u mnoha mikroorganismů, jakými jsou například *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Alcaligenes spp.* Glyfosát je odbouráván na netoxické látky (Ondřej & Drobník, 2002).

b) Resistance ke glufosinátu

Jedná se o neselektivní, postemergentní herbicid, využívaný v sadech a vinicích, chemicky 4-[hydroxy-(metyl)fosfinoyl]-D,L-homoalanin. Distribuuje se pod obchodními názvy Liberty, Basta, Finale, Radicale atd. Látka je také známá pod názvem fosfinotricin (Řepková, 2013b). Po použití dochází k narušení metabolismu, a tedy k přerušení fotosyntézy. Vložené geny nevratně inaktivují enzym glutaminsyntázu, který se podílí na degradaci amoniaku. Tím pádem se amoniak nemůže rozkládat na glutamát a v buňce se hromadí. Vysoké koncentrace NH_3 zastavují fotosyntézu a rozkládají chloroplasty. Následkem rostlina vadne a umírá. Symptomy jsou viditelné zhruba do 2-7 dnů a dávky se pohybují v rozmezí 0,4 - 1,2 kg na hektar (Ondřej & Drobník, 2002).

Transgeny pocházejí z bakterie *S. hygroscopicus* – nazývají se *bar* geny, a z bakterie *S. viridochromogenes* – nazývají se *pat* geny. Díky nim dochází k syntéze enzymu fosfinotricin-N-acetyltransferázy, která acetyluje (zavádí acetylovou funkční skupinu) volnou NH_2 – skupinu herbicidu a tím jej inhibuje (Ondřej & Drobník, 2002).

c) Resistance k dalším herbicidům

Mezi další možné využívané herbicidy lze řadit chlorsulfuron, bromoxynil, fenmedifam a kyselinu 2,4 - dichlorfenoxyoctovou.

Chlorsulfuron patří mezi herbicidy schopné blokovat aktivitu enzymu acetolaktátsyntázy – zkráceně ALS nebo AHAS (z anglického acetohydroxyacid synthase). Tento enzym přítomný u bakterií, hub a rostlin je prvním enzymem v řadě biosyntetické dráhy esenciálních rozvětvených aminokyselin – valinu, leucinu a izoleucinu. Blokace enzymu spočívá v navázání herbicidu ve vazebném místě ALS. Jedním ze způsobů tolerance k ALS-herbicidům, je mutace genu ALS, a to konkrétně mutace genů kódujících vazebné místo ALS. Enzym je poté rezistentní k těmto typům herbicidů. Chlorsulfuron se vyrábí pod obchodním názvem Glean, jeho chemický název je 1-(2-chlorfenylsulfonyl)-3-(4-metoxy-6-metyl-1,3,5-triazin-2-yl)-močovina. Existuje celá řada podobných látek (triasulfuron, tribenuron, atd.). Jedná se o netoxické herbicidy pro živočichy (Ondřej & Drobník, 2002).

Bromoxynil, jehož chemický název je 3,5-dibrom-4-hydroxybenzonitril, je herbicid schopný inaktivovat fotosystém II u rostlin - nazýváme jej fotosyntetický inhibitor. Mezi jeho výhodné vlastnosti patří krátká životnost v půdě (poločas rozpadu je asi 2 týdny), neboť je velmi rychle rozkládán bakteriemi¹². Toho se využilo při konstrukci rezistentního tabáku tím, že z jedné půdní bakterie – *Klebsiella azoleae*, byl izolován gen *bxn*, který přináší informaci o enzymu nitriláza. Tento enzym je schopen měnit bromoxynil na kyselinu 3,5-dibrom-4-hydroxybenzoovou za současného uvolňování amoniaku (Ondřej & Drobník, 2002).

Kyselina 2,4 – dichlorfenoxyoctová (krátce 2,4 - D) je chlororganický herbicid, řazený také mezi rostlinné auxiny (rostlinné hormony podporující prodlužování buněk). V malých dávkách účinně podporuje růst buněk, avšak při vyšších koncentracích jsou její účinky opačné a dochází k usmrcení rostliny vlivem výkyvů rovnováhy fytohormonů, což vede k abnormálnímu růstu, tvorbě tumorů a podobně (Grycová, 2012). Vlivem půdních bakterií, kvasinek a hub se rozkládá za zhruba 5-6 týdnů. Izolací genu (degradace je podmíněna šesti geny) z půdní bakterie *Alcaligenes eutrophus* bylo možné vytvořit GMP – tabák a bavlník.

¹² Extension Toxicology Network: *Pesticide information profiles* [online]. 1996 [cit. 2017-03-08]. Dostupné z webu <http://ace.orst.edu/info/extoxnet/pips/bromoxyn.htm>

Tento gen *tfdA* rozkládá 2,4 – D na 2,4 – dichlorfenol (Ondřej & Drobník, 2002). Dalšími plazmidy kódujícími schopnost štěpit tento herbicid je pJP1 bakterie *Alcaligenes paradoxus*, dále pJP3, pJP4, pJP5 a pJP7 které navíc přinášejí schopnost štěpit další látky, jakými jsou 4-chlor-2methylfenoxyoctová kyselina či m-chlorbenzoová (Košťál & Demnerová, 1999).

Fenmedifam, herbicid z poměrně nové skupiny, má specifické schopnosti působit na proteiny fotosyntézy, čímž ji inhibuje. Patří mezi karbamátové sloučeniny (organické sloučeniny odvozené od kyseliny karbamové (NH₂COOH)). Díky izolaci genu pro enzym hydrolyzující (rozkladná reakce, při které se spotřebovává voda) fenmedifam z bakterie *Arthrobacter oxidans* bylo možné vypěstovat rostliny odolné vůči tomuto herbicidu (Ondřej & Drobník, 2002).

Vytvořením Ht-GMP rostlin se výrazně snížila spotřeba herbicidů, a to především těch typů, které se preventivně vnášejí do půdy (preemergentní herbicidy). Díky transgenním rostlinám lze herbicidy aplikovat v dávkách, které se řídí faktickým stavem vegetace a druhy plevelů. Klasické herbicidy také mohly nahradit nové druhy, které se rychleji odbourávají, jsou téměř netoxické a ohleduplnější k životnímu prostředí, zemědělcům i spotřebiteli (Ondřej & Drobník, 2002). Běžná spotřeba čítá dekgamy až kilogramy na hektar (Šifner & kol., 1998). Možnými riziky pro člověka jsou především toxické nebo alergenní účinky enzymu, či teratogenní anebo karcinogenní vlivy herbicidů či dalších látek, které jsou produkovány jako vedlejší produkty aktivity enzymu (Ondřej & Drobník, 2002). Riziky plynoucími pro životní prostředí se více zabývá následující kapitola Riziko superplevelů.

Nejčastějšími Ht-GM plodiny jsou kukuřice, sója, rýže, cukrová řepa, řepka, bavlna a pšenice (Vondřejš, 2010).

Riziko superplevelů

Superplevele, jakožto hypotetické riziko pěstování plodin rezistentních vůči herbicidům, jsou jedním z nejpoužívanějších argumentů odpůrců GMO. K jejich vzniku by potenciálně mohlo dojít dvěma způsoby: zaprvé mutací GMP a zadruhé horizontálním přenosem genů GMP (Drobník, 2008).

První zmíněný způsob se zaměřuje především na přespříliš časté užívání jednoho typu herbicidu. Tímto způsobem však již v současné době vznikly rostliny odolné až k pěti různým herbicidům, nejedná se však o rostliny transgenní, ale běžně rostoucí, a to konkrétně rdesno červinec a merlík tuhý (Drobník, 2008). Druhý způsob, tedy přenos transgenů sprašováním na příbuzné plevelné druhy, se týká především užitkově velmi perspektivní řepky. Příbuzné druhy řepky jsou považovány za plevel. Možnost přenosu transgenů pylem je však extrémně nízká. Pokud by však taková možnost nastala a vznikla by populace plevelů rezistentní k určitému druhu herbicidů, znamenalo by to pouze, že se na určitou dobu musí herbicidy změnit. Předcházet tomuto možnému riziku je poměrně jednoduché, a to střídáním plodin a nepoužíváním stejného herbicidu na jednom poli více let po sobě (Ondřej & Drobník, 2002).

3.2.2 Transgenoze geny pro toleranci k hmyzím škůdcům

Hmyz, jakožto škůdce rostlin, lze likvidovat rozstřikováním velkého množství insekticidů. Je však problémem, že tyto insekticidy mohou být nebezpečné i pro jiné živočichy. Proto byly vytvořeny tzv. Bt-plodiny. Na začátku vzniku Bt-plodin stojí bakterie *Bacillus thuringiensis*. Tato grampozitivní bakterie objevená v Japonsku již v roce 1902 dokáže na konci svého životního cyklu vytvořit nepříznivým podmínkám odolnou sporu. Ta má zajistit, že rod bakterie přežije. Tyto spory obsahují mimo jiné speciální látku – protein, který krystalizuje a nazývá se bílkovina Cry nebo také delta-endotoxin. Struktura této bílkoviny je složena z jednoho nebo více typů proteinových subjednotek. Tato látka, zvaná enterotoxin, neboť rozrušuje střevní trakt, dokáže velmi specificky hubit určitý hmyz, který poté slouží jako potrava pro potomky bakterie. Evolučně vzniklo velké množství těchto proteinů, které se liší specificitou na určitý druh hmyzu. Dnes známe asi 150 genů pro enterotoxiny (Drobník, 2008).

Nejprve dochází k pozření bílkoviny hmyzem. K aktivaci delta-endotoxinů dochází až působením pH v trávicím traktu hmyzu, který krystalický protein rozpouští (Ondřej & Drobník, 2002). Již zde se uplatňuje výběrovost, neboť jen vhodné pH dokáže bílkovinu rozpustit – motýli, moli a můry (*lepidopter*) mají ve střevech silně alkalické prostředí, avšak brouci a jejich larvy neutrální až mírně kyselé. Proto v toxinu působícím proti *lepidopter* převažuje arginin, zatímco toxiny proti broukům obsahují méně bazický

lysin (Drobník, 2008). Obratlovci jsou vůči tomuto toxinu imunní proto, že ve svém trávicím traktu mají pH kyselé (Šifner & kol., 1998). Následně je delta-endotoxin vystaven účinkům proteáz, které odštěpí některé určité části proteinu, až vznikne výsledný menší polypeptid, který teprve představuje aktivní toxin. Tato látka se specificky váže na apikální část kartáčkovité membrány výstelky střev hmyzu. Fáze navázání jsou dvě – vratná (reverzibilní) a nevratná (ireverzibilní), při které se předpokládá navázání toxinu na receptor – pravděpodobně se jedná o glykoproteiny nebo proteiny s vysokým obsahem aminokyselin asparaginu a glutaminu nebo hydrofobních aminokyselin, kterými jsou například valin nebo leucin. Po navázání toxinu dochází k rozpadu plazmatické membrány, vytváří se otvor, který není buňka schopna zacelit a postupně dochází k destrukci střevního traktu. Následnou sepsí dochází k úhynu toho, jenž krystal pozřel (Ondřej & Drobník, 2002).

Těchto vlastností se pochopitelně využilo a plodiny se bakteriemi *B. thuringiensis* začaly postříkovat. Problém však byl, že se toxin na rostlinách dlouho neudržel, smýval se vlivem deště nebo jej ničilo záření. Kromě toho někteří škůdci, mezi nimi například zavíječ kukuřičný, se zavrtávají do dřevě stébel a je tedy nemožné je zasáhnout postřikem. Proto byly vytvořeny Bt-rostliny, které mají gen pro produkci Bt-toxinu přímo zabudovaný v genomu, a dokáží tak bílkovinu přímo produkovat (Ondřej & Drobník, 2002).

Tyto rostliny, nazývané také rostlinné nebo zelené pesticidy, jsou velmi výhodné právě proto, že nepotřebují ke své ochraně žádné další látky, ale dokáží se chránit sami. Delta-endotoxin je úzkospektrální toxin, protože, jak již bylo řečeno výše, působí pouze na cílenou skupinu škůdce, nikoliv na jiný rostlině prospěšný hmyz. Kvůli nízké expresi genu izolovaného z bakterií (nízká stabilita m-RNA, bakteriální geny neobsahují introny, které zvyšují expresi atd.), se začal uměle syntetizovat *in vitro* (Ondřej & Drobník, 2002).

Problémy u Bt-plodin se týkají především mutací hmyzu, který se stává na nově zavedený způsob imunní. Například na Havaji, kde se dlouhodobě používaly postřiky založené na působení Bt-toxinu, byl hmyz rezistentní ještě dříve, než se transgenní plodiny odolné vůči hmyzu vůbec začaly pěstovat (Drobník, 2008). V takovém případě, stala-li by se populace rezistentní, je třeba stávající transgen nahradit jiným. Aby k této situaci nedošlo, byla vypracována celá řada postupů, jak tomuto scénáři zamezit. Například metoda refugií (útočišť) je postavena na záměru, že resistance k insekticidům je recesivní, což vede

ke zvýšené citlivosti u heterozygotního hmyzu. Jestliže se nechá vedle pole s transgenní odrůdou pole netransgenních jedinců, pak na něm je schopný přežít hmyz citlivý vůči Bt-toxinu. Samečci z tohoto netransgenního pole pak mohou přeletět na pole s transgenními rostlinami, a ještě před tím, než uhynou v důsledku pozření Bt-plodiny, oplodní samičky rezistentní vůči toxinu. Vzniklá generace heterozygotních potomků, už není vůči Bt-toxinu odolná a pozřením transgenní rostliny umírá. Tento postup se běžně využívá například u kukuřice. Nedochází sice k úplnému vyřešení problému, ale nárůst rezistence hmyzu vůči plodinám odolným k hmyzu to výrazně zpomaluje. Důležité je také zmínit, že metody zabráňující získání rezistence hmyzu k Bt-plodinám zpomalují tuto tendenci mnohonásobně více. Tím oddalují získání rezistence účinněji, než jak je tomu při vzniku rezistence hmyzu k insekticidům. Navíc se odhaduje, že ve chvíli, kdy dojde ke vzniku rezistentní populace, budou již existovat odrůdy, které budou umět využívat docela jiných metod obrany proti hmyzím škůdcům (Ondřej & Drobník, 2002).

Zajímavé také je, že tvorba látky bránící hmyzu poškozovat rostlinu, není nic nepřírodního. Rostliny mají různé mechanismy ochrany proti predátorům – štiplavé silice cibule, solanin v bramborách, alylisothiokynát v křenu a jiné. Přítomnost Bt-toxinu v buňkách rostlin má tu výhodu, že k úhynu hmyzu dochází pouze tehdy, když rostlinu pozře (Drobník, 2008).

První Bt-plodiny byly vytvořeny již v roce 1983, ačkoliv publikovaný materiál k tomuto tématu vyšel až později. Prvními rostlinami schopnými bránit se hmyzím škůdcům byly rajče a tabák (Ondřej & Drobník, 2002). První transgenní odrůdy se začaly pěstovat v roce 1996. Některé transgenní rostliny, mezi nimi například bavlník, mohou mít účinnost ochrany sníženou. U zmiňovaného bavlníku je účinnost asi 90-95 %. Škůdci musí být likvidováni ještě postřikem pesticidů, avšak z běžně používaných 5-12 postřiků za vegetaci, se četnost u transgenního bavlníku snížila jen na max. 3 postřiky. Tento problém byl jeden z hlavních argumentů odpůrců Bt-plodin, společně s dezinformacemi o škodlivosti vůči lidskému zdraví, které vznikly prohlášením velmi předběžných výsledků některých experimentů. Dnes se GMP odolné vůči hmyzu staly součástí velkého množství kulturních plodin, příkladem může být kukuřice odolná vůči zavíječi kukuřičnému, brambory rezistentní vůči škození mandelinky bramborové nebo bavlník odolný proti makadlovce bavlníkové (Custers, 2006).

3.2.3 Transgenoze geny pro rezistenci vůči virům

Viry, jakožto organismy schopné infikovat řadu rostlinných druhů, se projevují celou škálou symptomů. Tyto tzv. fyto-viry mohou působit specificky pouze na jednoho hostitele, jak je tomu například u viru proužkovitosti ječmene, anebo mohou napadat větší množství různých rostlin, například virus okurkové mozaiky (Ondřej & Drobník, 2002).

Rostlinné buňky mají kolem svého povrchu, na rozdíl od buněk živočišných, buněčnou stěnu, která je chrání před napadením viru, jelikož vně buňky nejsou žádné receptory, kam by se vir mohl navázat, jak je tomu u buněk živočišných. Mechanismus přenosu virů do rostlinných buněk musí tedy probíhat přes vektor, kterým může být hmyz, houba nebo obyčejné mechanické poškození.

Uvnitř buněk se virus replikuje, k čemuž využívá a přeměňuje rostlinný replikační aparát. Obvykle je tvořen virový genom rostlinných virů jednořetězcovou molekulou RNA a plášťovým proteinem. Přenos virů do celé rostliny zajišťuje jednak cévní systém rostlin, anebo plazmodezmata spojující jednotlivé buňky (Řepková, 2013a).

Je známo více jak 500 druhů rostlinných virů, z nichž nejméně polovina způsobuje závažná onemocnění kulturních rostlin. Ztráty sklizně kvůli těmto chorobám jsou odhadovány na zhruba 15 % (aktuální pro rok 2002). Kromě toho jsou rostliny napadené viry více náchylné k onemocnění bakteriálnímu či houbovému (Ondřej & Drobník, 2002). V takovém případě může docházet k napadení rostliny i takovými organismy, jako je například *Aspergillus flavus*, houba způsobující plíseň obilí, která kromě jiného produkuje velké množství aflatoxinu – karcinogenní a akutně toxické sloučeniny (Štefánek, 2011).

Jedna z metod, jak ochránit rostliny před napadením viry, souvisí s výše uvedeným plášťovým proteinem. Hypotéza, že hostitel se stává rezistentní, pokud u něj dochází k tvorbě určitých částí nukleových kyselin patogena, byla vyslovena již v roce 1985 a o rok později se ukázala jako správná, neboť byl tento mechanismus využit k ochraně tabáku před virem tabákové mozaiky (zkráceně TMV) (Šifner & kol., 1998).

Plášťový protein je zpravidla kódován jedním virovým genem. Pokud se tento gen přenesení do rostlinné buňky, začlení se do její genetické informace a trvale se projevuje, rostlina získává odolnost vůči onomu konkrétnímu viru. Zdrojem transgenů pro plášťové proteiny

jsou viry (Šifner & kol., 1998). Odolnost může být úzkospektrá, jak je tomu u výše zmíněné TMV či bramborového viru Y, ale také širokospektrá, jak se ukázalo u některých kmenů virů mozaiky sóji, která vnáší do tabáku také rezistenci proti leptavosti tabáku a bramborového viru. Zároveň je přímá souvislost mezi množstvím produkovaného plášťového proteinu a stupněm rezistence, tedy některé cíleně mutované geny *in vitro* zvyšovaly rezistenci rostliny nad rámec původního plášťového proteinu (Ondřej & Drobník, 2002).

Druhou známou metodou je inhibice přenosu viru z buňky do buňky. Gen pro plášťový protein kóduje mimo jiné také protein pro pohyb a replikázu. Protein pro pohyb zajišťuje šíření viru z jedné do druhé buňky, avšak použitím transgenů vznikají chybné proteiny, které se hromadí v plazmodesmatech a zabráňují tak pohybu viru (Ondřej & Drobník, 2002).

Třetí metoda se týká replikázy, která je inhibována působením transgenu, odolnost je zaměřena pouze na kmen viru, ze kterého transgen pochází, avšak přesný mechanismus není znám (Ondřej & Drobník, 2002).

3.2.4 Transgenoze geny pro toleranci vůči houbovým a bakteriálním onemocněním

Houby jsou z valné většiny saprofyté (získávají energii z organických látek odumřelých organismů nebo jejich částí), zhruba 10 tisíc druhů hub se však živí parazitismem na rostlinách. Tyto vnější choroby mohou pouze snižovat vitalitu rostlin, avšak mohou mít až nekrotrofní účinky, kdy vlivem účinku toxinů nebo enzymů dochází k odumírání částí rostliny. Mezi časté houbové parazity rostlin patří hlavně padlí, rzi nebo sněti. Tento druh získávání potravy vázaný na živý organismus nazýváme biotrofní parazitismus (Řepková, 2013a).

Některé bakterie mohou žít s rostlinami v symbióze, jiné jsou patogenní. Zhruba 100 druhů bakterií způsobuje choroby rostlin. Bakterie podobně jako houby odbourávají pektin – hlavní stavební materiál rostlinné buněčné stěny. Samy pak přežívají v mezibuněčných prostorách různých orgánů nebo v dřevním cévním svazku. Vedle toho často produkují toxiny, které mohou spolupracovat při vzniku choroby. Toxiny působí na cílovou molekulu, obvykle enzym, který inaktivují.

Bakteriální geny, které způsobují onemocnění rostlin, jsou zmapovány a získávány lépe než houbové, především díky možnostem bakteriální genetiky a genového inženýrství. Degradací dráha pektinu je dnes již v zásadě dobře známa (Řepková, 2013a).

Mechanismus získávání rezistence je obdobný jako u výše zmíněných případů, například v kapitole 3.2.1 Transgenozie geny pro toleranci k herbicidům.

Transgeny v tomto případě mohou být:

I. Chitinázy a Beta-1,3-glukanázy

Hydrolýzou rozkládají chitiny a glukany. Oba tyto sacharidy jsou součástí buněčné stěny velkého množství hub a tvoří střídající se vrstvy. Je tedy vhodné používat oba transgeny společně. Rozkladem buněčné stěny dochází k nevratnému poškození stavby buněk hub (Ondřej & Drobník, 2002).

II. Proteiny inaktivující ribozomy

Mají schopnost nevratně poškodit ribozomy hub a vyznačují se rovněž toxicitou. Inaktivace spočívá v glykozylaci (navázání řetězce glykanů) na puriny rRNA. Tyto transgeny s sebou často přinášejí také rezistenci vůči virům (Ondřej & Drobník, 2002).

III. Geny pro protein přenášející lipidy, tioniny a defenziny

Bílkoviny přenášející tuky (anglicky *lipid transfer proteins* – zkráceně LTP) zvyšují rezistenci k bakteriálním onemocněním. Mohou pocházet například z mykoparazitických hub anebo virů. Ukázalo se, že se velmi účinně angažují v imunitní obraně některých rostlin. Po infekci byla zjištěna poměrně vysoká koncentrace v pletivech. Dokáží totiž inhibovat růst patogenů (Lorenc, 2011). Tioniny jsou antimikrobiální peptidy, které způsobují zvýšenou průchodnost buněčné stěny hub přímým působením na fosfolipidy v membráně. Působí také na bakteriální stěnu. Jsou však toxické nejen pro houby, ale také pro buňky rostlinné a živočišné (Ondřej & Drobník, 2002). Tioniny rozdělujeme na α , β a γ , avšak poslední, ač jsou stejného původu, se strukturně od prvních dvou typů odlišují a měly by být spíše řazeny k defenzinům (Lorenc, 2011).

Defenziny jsou antifungální peptidy, které neusmrcují houbovou buňku, pouze zpomalují růst houbových hyf a stimulují jejich větvení inhibicí syntézy proteinů a některých enzymů, například α -amylas (Lorenc, 2011).

IV. Bílkoviny podobné taumatinu

Tyto proteiny, které jsou podobné sladce chutnajícímu zásobnímu proteinu taumatinu, který byl izolován z afrického keře *Thaumatococcus daniellii*, byly nalezeny v různých rostlinných orgánech, například v semenech, plodech, listech a pletivech u mnoha rostlinných druhů. Jsou schopné degradovat buněčnou stěnu (Lorenc, 2011). Mezi tyto proteiny řadíme například osmotin, který se hromadí v tabáku jako odpověď na osmotický stres anebo zeamatin, který nacházíme v kukuřici (Ondřej & Drobník, 2002).

Zajímavé je, že transgenem pro rezistenci rostlin vůči bakteriím může být i lidský gen, a to konkrétně kódující laktoferin, hlavní protein mateřského mléka, který chrání proti mikrobiálním infekcím. Tento gen byl vnesen do genomu tabáku, který vykazoval silnou antibakteriální aktivitu (Ondřej & Drobník, 2002).

3.2.5 Produkce farmakologicky významných látek – protilátek, rostlinných vakcín, vzácných proteinů

Protilátky

Protilátka, či také imunoglobulin, je látka bílkovinné povahy, která má schopnost rozpoznat a zneškodnit cizorodé organismy v těle, kterými mohou být například viry nebo bakterie. Tvoří funkční jednotku humorální imunity. Přirozeně vznikají v mízní tkáni (Hořejší & Bartůňková, 2009).

Chemicky je imunoglobulin glykoprotein, jehož struktura má tvar písmene Y. Skládá se z polypeptidových řetězců – ze dvou strukturně identických lehkých (L, light) řetězců a dvou rovněž stejných těžkých (H, heavy) řetězců, které propojují disulfidových můstků. Každý řetězec je tvořen dvěma oblastmi – konstantním úsekem, který je tvořen relativně stálou

sekvencí aminokyselin a variabilní oblastí – Fab-fragментy (z anglického antibody binding fragment), kterou se jednotlivé imunoglobuliny odlišují (Řepková, 2013a).

Variabilní úsek můžeme dále členit na čtyři základní úseky, které jsou stálé a tři hypervariabilní oblasti, které jsou značně proměnlivé. Tyto nestálé úseky tvoří vazebná místa pro antigen. Jsou to krátké úseky, tvořící jen malou část molekuly, tzv. Fv-domény. Výběrovost imunoglobulinu je tedy dána primární strukturou těchto variabilních oblastí. V průběhu jejich zrání v lidském těle navíc dochází k rekombinacím v uvedených oblastech, což má za následek obrovskou variabilitu genů, stejně jako velké množství různých imunoglobulinu v organismu (Ondřej & Drobník, 2002).

Dle typu těžkého řetězce u člověka rozlišujeme 5 tříd imunoglobulinů:

IgG se nacházejí jako protilátky v séru,

IgM se vyskytují jako receptory na povrchu B-lymfocytů,

IgA se vyskytují ve slinách,

IgD působí jako receptory v nezralých lymfocytech,

IgE se vyskytují při parazitární imunitní odpovědi (Ondřej & Drobník, 2002).

Aby rostlinné buňky imunologicky odpovídaly, stačí, aby syntetizovaly oblasti Fv-domén. Geny, které tyto oblasti kódují, lze klonovat, upravovat a vkládat do jiných buněk. Upravené geny nemusí obsahovat celý lehký a těžký řetězec, stačí, aby odpovídaly úseku Fab-fragmentů, tedy variabilní oblasti, dokonce stačí, aby obsahovaly lehké, jednovláknové řetězce (ne v podobě dimerů, jak je tomu u lehkých řetězců původního imunoglobulinu). Vzniklé látky nazýváme monoklonální protilátky, tedy takové, které produkují jen jeden typ protilátky. Má-li vzniknout celá protilátka, je nutné vložit informace jak o těžkém, tak lehkém řetězci. To lze jednak vložením úseku DNA, který nese informace o obou řetězcích, anebo mohou být geny přítomné na dvou odlišných transgenních liniích. Jejich křížením poté vznikne daná protilátka.

Původní označení protilátek produkovaných rostlinami bylo plantibodies, slovem odvozeným z antibody – protilátka. První publikace o monoklonálních antibiotikách syntetizovaných transgenními rostlinami byla vydána již v roce 1989. První rostlinou produkující kompletní protilátku byl tabák, do něhož byl vložen myší imunoglobulin IgG1. Syntéza proběhla následujícím způsobem – nejprve vznikly dvě transgenní linie, které měli vždy jeden gen pro těžký a jeden gen pro lehký řetězec. V druhém bodě byly kříženy rostliny s rozdílným řetězcem za vzniku hybridu, který měl v genomu oba tyto geny. Protilátka byla produkována v listech (Řepková, 2013a).

Vzniklé protilátky mohou sloužit dané rostlině proti některým regulačním proteinům či nízkomolekulárním látkám, rovněž mohou plnit funkci ochrany vůči některým patogenům. Tento proces nazýváme imunizace. Patogeny mohou být nejen viry (transgenní tabák odolný vůči viru mozaiky artičoku – viz kapitola Transgenozé geny pro rezistenci vůči virům), ale také houboví škůdci, hmyzí škůdci či hádátka. Rezistence proti posledně jmenovaným prokazatelně nastává při vyšší koncentraci IgM protilátek. Dalším příkladem by mohla být protilátka z tabáku proti *Streptococcus mutans*, který způsobuje zubní kaz v dutině ústní. Protilátky dokáží nalézt streptokokový antigen a zabráňují jeho rozšíření v ústech. Postup tvorby protilátky byl stejný jako u myšího imunoglobulinu IgG1, který byl popsán výše (Řepková, 2013a).

Rovněž mohou protilátky rostlině přinášet nové vlastnosti. Proces získání přirozeně nepřítomných znaků nazýváme imunomodulace. Podstata spočívá ve změně funkce odpovídajícího antigenu, a to různým způsobem. Důsledkem vazby antigenu na protilátku může být například změna směřování antigenu do jiné části rostliny, než je odpovídající enzym, může být zpomalena enzymová reakce, vazba může působit na prostorovou stavbu enzymu a podobně. Imunomodulace byla využita kupříkladu při změnách činnosti fytohormonů.

Po izolaci protilátek či jejich fragmentů z rostliny a úpravách mohou být také průmyslově využity k lékařským účelům či jako činidla v imunochromatografii. Nejenže získávání protilátek z rostlin je levným zdrojem imunoglobulinů, je však také možné řídit jejich ukládání do semen, kde mohou být dlouhodobě skladovány. Bylo také dokázáno,

že konzumací transgenních rostlin tohoto typu se navozuje pasivní imunizace (Ondřej & Drobník, 2002).

Již v roce 2000 ohlásila firma Monsanto vlastnictví protilátek proti herpesvirům. Jejich transgenní rostlinou byla sója. Dle předpokladů by transgenní rostliny mohly působit antikoncepčně tvorbou protilátek proti spermii. Velký přínos má také vakcína schopná bránit růstu nádorových buněk, prozatím experimentálně zkoušená na myších. Existující vakcína produkovaná savčími buňkami v kultuře je velmi drahá, transgenní rostliny by však tento problém mohly levně vyřešit (Ondřej & Drobník, 2002).

Rostlinné vakcíny

Očkovací látka či též vakcína, je taková látka, která po aplikaci do organismu vyvolává imunologickou reakci proti určité nemoci. Vhodná vakcinace je účinná a neškodná pro organismus, standardním procesem podání vakcíny je očkování. Vakcína může obsahovat živé, ale oslabené mikroorganismy, anebo jejich usmrcené formy. Současně získávané vakcíny jsou produkovány hlavně savčími, hmyzími a kvasinkovými kulturami, avšak tato metoda je poměrně drahá vzhledem k mediu, kterým se kultura živí a procesu čištění, které musí podstoupit, při izolaci látky (Čeřovská, 2012).

Transgenní rostliny jsou schopné produkovat proteiny shodné anebo strukturně velmi podobné těm, které produkují humánní patogeny, jenž napadají epiteliální membrány. Jsou to především mikroorganismy způsobující nachlazení ale také ty, které se přenášejí skrze kontaminované potraviny, krví či pohlavním stykem. Imunizační agens v tomto případě vyvolává zvýšenou tvorbu imunoglobulinů IgA, které jsou součástí imunitního systému sliznic, tedy především v trávicím a dýchacím traktu, kudy vstupuje do těla značné množství cizorodých částic (Ondřej & Drobník, 2002).

Imunita je v takovém případě aktivována konzumací čerstvé zeleniny a dalších rostlinných výrobků, jak již bylo zmíněno výše. Některé transgeny tohoto typu byly již patentovány v USA, zatím je nejskloňovanější rostlinou tabák, avšak do budoucnosti by byla vhodnější zelenina jako ředkvičky, mrkev, rajčata a jiné (Ondřej & Drobník, 2002). Značnou výhodu představuje ochrana látky před znehodnocením savčími toxiny a mikroorganismy. Ústním

podáním odpadá také nutnost injekčního podání látky, což celý proces dělá levnějším a dostupnějším především pro rozvojové země, nehledě na požadavky skladování a uchovávání běžně produkovaných vakcín v chladu (Čeřovská, 2012).

Nevýhodou je především těžko určitelná dávka rostlinné vakcíny, která je dána různě velkou variabilitou začlenění genu do genomu organismu. Vložený gen se může projevit v jednom anebo více znacích daného organismu, což může vést k nízké produkci požadovaných proteinů. Tento problém lze však částečně řešit vhodným zpracováním daného materiálu (Čeřovská, 2012).

Vakcíny jsou prozatím ve fázi testování na zvířecích modelech a některé ve fázi klinických testů pro nasazení u lidí (aktuální pro rok 2012), (Čeřovská, 2012). Co se týče transgenů v cizině, můžeme připomenout protein spaA ze *Streptococcus mutans*, který je zodpovědný za tvorbu zubního kazu zmíněný v kapitole Protilátky, povrchový antigen hepatitis B (též HBsAg), který úspěšně vyvolal imunologickou reakci u myši, nebo termolabilní enterotoxin B z *E. Coli*, který je stavebními, funkčními a antigenními rysy velmi podobný toxinu cholery. Podání transgenního tabáku a bramboru myši dokázalo vyvolat spuštění imunitní reakce (Ondřej & Drobník, 2002). Rovněž zajímavý je výzkum českého týmu z Ústavu experimentální botaniky Akademie věd, který se zabývá základním výzkumem kolem vakcín proti antigenům odvozeným z lidského papilomaviru typu 16 (HPV16), který se s největší pravděpodobností podílí na rakovině děložního čípku u žen (Čeřovská, 2012).

Vzácné proteiny

K velmi významným ale hlavně také úvodním objevům genového inženýrství patřilo klonování genů pro humánní inzulin, dále například interferony (cytokininy uplatňované hlavně v klinické praxi pro léčbu některých nemocí kvůli jejich antivirovým a imunomodulačním schopnostem) či genů pro růstový hormon. Tyto proteiny jsou však produkovány hlavně mikroorganismy či transgenními živočichy (Ondřej & Drobník, 2002).

Důležitým proteinem produkovaným transgenními rostlinami byl hirudin, protein přirozeně přítomný ve slinách pijavek. Jedná se o nejsilnější známý inhibitor trombinu, hlavní látky způsobující životu nebezpečnou trombózu. Klasická léčba tohoto onemocnění souvisela

s podáváním antitrombických látek, z nichž nejčastější je heparin, který má však své nevýhody. Hirudin, jakožto výhodnější alternace heparinu, byl již biochemicky syntetizován, a to pomocí *E. Coli*, kvasinek atd. Nicméně takto vytvořený protein neobsahuje anomální aminokyselinu tyrozin, na který se váže síra. Díky tomu není tak účinný jako přírodní produkt. Vložením upraveného genu do genomu brukve řepky (latinsky *Brassica napus*) tak, aby byl polypeptid kódující hirudin součástí komplexu proteinu oleozinu, bylo možné získat tuto bílkovinu z rostlin. Oleoziny jsou bílkoviny přítomné v membránách olejovitých tělísek v semenech rostlin, jsou snadno extrahovatelné a hirudin je od nich snadné proteolyticky odštěpit (Řepková, 2013).

Mezi další transgeny pro důležité proteiny patří gen pro faktor srážlivosti krve F VIII, který se využívá k léčení hemofilie, cytokin GM-CSF nezbytný pro zvýšení imunity během nebezpečí infekce po transplantaci kostní dřeně či lysozomy, enzymy schopné rozkládat makromolekuly, které by se jinak hromadily v buňce. Takové hromadění nechtěných látek může mít za následek i smrt ve velmi nízkém věku, jako je tomu například u Tayova-Sachsovy choroby (Ondřej & Drobník, 2002).

Důležité je také zmínit (v rámci farmakologického tématu), že transgenní odrůdy procházejí řadami testů z hlediska přítomnosti látek, které by mohly interagovat s jinými organismy či být potencionálně škodlivé. Jedná se především o nejrozumnější alergeny, alkaloidy, sekundární metabolity a podobně. Modifikované rostliny podléhají nejpodrobnějšímu komplexnímu zkoumání, jednak kvůli možným námitkám různých ekologických organizací, avšak především kvůli co nejvyšší míře eliminace poškození genomu vložením cizorodého genu, či odstranění případných mutací. Je také podstatné poznamenat, že rostliny a živočichové, kteří by mohli být zdrojem alergenů, se k izolaci transgenů nepoužívají (Šifner & kol., 1998).

3.2.6 Transgeny pro toleranci ke stresu

Stres, tedy nepříznivé podmínky, kterými u rostlin mohou být například zaplavení, nedostatek živin v půdě, nízké či naopak vysoké teploty, zasolení či míra ozáření, vyvolávají

u rostlin stresovou reakci v podobě aktivace obranných mechanismů. Stres, jakožto nedílná součást života rostliny je nepříjemný zejména proto, že rostliny nemají schopnost se přemisťovat a před stresem „utéct“ jako živočichové. Obvykle na rostlinu navíc nepůsobí jeden stresor, ale nastává řetězová reakce. Kupříkladu dochází-li k mrznutí či zasolení půdy, doprovází tyto podmínky také kyslíkatý stres. Proto jsou vybaveny účinnými obrannými mechanismy a schopností regenerace, kterou umožňuje totipotence (schopnost buňky vyvíjet se v jakýkoliv typ buňky, který se v rostlině vyskytuje). Rostlina může bojovat vůči stresoru adaptací, avšak ta je účinná zejména v rámci delšího časového intervalu. Působení stresových faktorů vede ke snížení vitality rostliny a u kulturních rostlin k jejich nižšímu hospodářskému výnosu. Zejména proto bylo získání rezistentních transgenních rostlin předmětem zájmu mnoha šlechtitelů (Procházka, 1998).

Postup získání rostliny schopné odpovídat na stresové faktory je značně podobný předešlým vylepšením – je nutné najít organismus, který je schopný přežít v extrémních podmínkách prostředí (chlad, sucho, nedostatkem nebo naopak nadbytkem nějakého životně důležitého faktoru – kyslík, voda, atp.), dále nalézt a izolovat geny, které přinášejí toleranci k těmto podmínkám. Tyto geny je nutné vnést a začlenit do rostlinného genomu a studovat chování transgenních i netransgenních jedinců při působení extrémních podmínek. Posledním krokem je vpravit geny do kulturních rostlin a studovat je v polních podmínkách (Ondřej & Drobník, 2002).

V následujících bodech budou uvedeny typy abiotických stresů a možnosti získání resistance:

Stres z nedostatku vody

Nedostatek vody může nastat obyčejným suchem v dané oblasti, ale také zasolením půdy, nízkými teplotami a podobně. Vodní deficit vede ke ztrátě turgoru a projevuje se zastavením růstu a vadnutím. Při nedostatku vody jsou rostliny citlivější k působení dalších stresorů. Není-li dostatečné množství vody, dochází k redukci stupně fotosyntézy, pokud je však dostatečné množství světelné energie, nastane fotoredukce kyslíku, který se mění v aktivní molekuly, především superoxydy a peroxidy. Tyto molekuly významně poškozují membrány i enzymy. Rostlina se přirozeně chrání před těmito reakcemi hlavně aktivitou peroxidáz a superoxiddismutáz (tento enzym přeměňuje superoxidový radikál na molekulární kyslík

a peroxid vodíku, který je dále rozložen katalázou nebo peroxidázou), (Ondřej & Drobník, 2002).

Zvýšení účinnosti pomocí transgenoze bylo dosaženo u tabáku a bramboru. Tyto rostliny v sobě hromadí osmoprotektivní látku glycinbetain (*N,N,N-Trimethylglycin*), která brání letálním ztrátám vody z cytoplazmy. Syntézu této látky lze podpořit například vložením genu pro enzym cholinhydrogenázu z *E. Coli*, čímž byly získány brambory a tabák odolné k zasolení půdy a zmrznutí. Podobného výsledku bylo dosaženo také vložením genu kódujícího enzym cholinoxidázu, získaného z *Arthrobacter globiformis*. Rostlina poté syntetizovala prolin, který má podobný vliv jako glycinbetain. Zvýšená tvorba prolinu byla zaznamenána také u tabáku, do kterého byl vložen gen *p5cs*, získaný z rostliny *Vigna aconitifolia*. Transgenní tabák v sobě hromadil 10-18 krát více prolinu než jeho netransgenní forma (Ondřej & Drobník, 2002).

Zvýšené odolnosti rostlin k suchu a k nízkým teplotám lze dosáhnout také vložením genu *SacB* z *Bacillus subtilis*. Tento gen kóduje enzym levansukrázu, který vede k syntéze a hromadění fruktanů (Řepková, 2013b) Fruktanty, větvené polymery fruktózy, jsou vedle škrobu důležitými zásobními cukry některých semenných rostlin, produkují je však i bakterie. Nejen že jsou velmi dobře rozpustné ve vodě, ale nepodléhají krystalizaci při nízkých teplotách, rovněž jsou schopné syntézy při teplotě mrazu. Jsou to látky způsobílé stabilizovat membránu – depolymerací a opětnou polymerací (Řepková, 2013b) a nepřímo přispívají k odolnosti vůči mrazům a dehydrataci (Kettnerová, 2012).

Řešení problému se zasolováním půdy proběhlo na základě poznatku, že rostliny obsahují protein, který váže krystalky soli a ukládá ji v separovaných částech uvnitř buňky. Je-li však přísun soli příliš velký, protein nestačí všechny krystalky zabudovat a volná sůl poškozuje přirozené biochemické dráhy v rostlině, což vede ke snížení vitality a smrti. Díky této informaci bylo vytvořeno geneticky modifikované rajče, které tvořilo větší množství transportního proteinu. Díky tomu rostlina snesla zalévání až 50krát slanější vodou. (Řepková, 2013b) Gen *AtNHX1* byl získán z *Arabidopsis thaliana* (česky Huseníček rolní), (Ondřej & Drobník, 2002).

Stres z chladu, mrazu

Snížení teploty nejenže ohrožuje rostlinu nedostatkem vody při tvorbě ledu, propíchnutím membrán organel, ale také omezuje fluiditu membrány rostlin. Významný vliv na citlivost rostliny k chladu má stupeň nenasycenosti mastných kyselin v membráně plastidů. (Řepková, 2013b) Hlavní vliv mají dvojné vazby v cis struktuře lipidů tvořících membránu. Vložením jaderného genu pro chloroplastovou ω -3-mastnou kyselinu získaného z *Arabidopsis*, který katalyzuje tvorbu těchto dvojných cis vazeb mastných kyselin, nebo ω -6-desaturázy z *Anacystis nidulans* s obdobnými účinky, vedlo u tabáku ke zvýšení odolnosti vůči chladu.

Další možností je zvýšení produkce proteinů, které jsou homologické s tzv. protimrznoucími proteiny (z anglického *antifreeze proteins*) arktických ryb. Ty mají schopnost zastavovat růst krystalů ledu.

V neposlední řadě lze k ochraně před chladem využít cholinoxidáza či glycinbetain popsané výše (Ondřej & Drobník, 2002).

Stres z přítomnosti kyslíkatých intermediátů

Zasolení půdy, zaplavení, sucho i chlad vyvolávají stresové reakce, které jsou často doprovázeny tvorbou aktivních molekul kyslíku – kyslíkatých radikálů, které poškozují membrány, konkrétně peroxidací lipidů (proces, kdy volné radikály odebírají elektrony lipidům), denaturují proteiny (oxidují různé funkční skupiny) a mitochondrie, což vyvolává další stres. K jejich vychytávání se využívá antioxidantů, genů, které přinášejí informace jak o enzymatických, tak neenzymatických (například kyselin askorbová, glutathion, karotenoidy a jiné) látkách. Enzymaticky se rostlina sama dokáže bránit tvorbou enzymů, například superoxiddismutázou, avšak jejich množství nemusí být vždy dostatečné (Řepková, 2013b). Cílem genetického inženýrství bylo zvýšit množství enzymatických látek, což se také povedlo u vojtěšky a následně u tabáku, kterému byl vložen gen z *Arabidopsis thaliana*. Výzkumy prokázaly, že nejvyšší exprese genu nastává tehdy, je-li superoxiddismutáza směřována do chloroplastů (Ondřej & Drobník, 2002).

Stres vyvolaný působením chemických látek a toxických těžkých kovů

Toxické ionty či přítomnost těžkých kovů, které znečišťují půdu a vodu, působí nestabilitu minerální rovnováhy ovlivněním buněčné látkové přeměny. Z ovzduší, které je kontaminované především oxidy síry a dusíku, čpavkem a ozónem, pronikají toxické a oxidativní plyny do rostlin průduchy či přes kutikulu transpirací. Oxidy reagují s buněčnou vodou za vzniku příslušných kyselin (tyto procesy probíhají i v atmosféře a jsou známy jako kyselá deště). Dochází jednak ke zrychlenému stárnutí, ve vyšších dávkách k viditelnému poškození rostliny (Řepková, 2013b).

Jednou z častých chemických látek způsobujících stres vegetace, mimo jiné i u nás především v severních Čechách, je sulfan (dříve sirovodík). Díky vložení správného genu se podařilo vytvořit rostliny, které jsou odolné vůči sirovodíku, a dokonce jej dokáží zužitkovat. Jedná se o gen kódující O-acetylserinlyázu (také cysteinsyntáza) z pšenice, který byl vložen do tabáku. Většina rostlin využívá sulfáty pro příjem síry, která je nezbytnou součástí lipidů, koenzymů a hlavně aminokyselin. Transgenní tabák byl schopen přežít v toxických hladinách sirovodíku v atmosféře, navíc prospíval i při nedostatku síry v půdě, neboť byl schopen využít sulfan při syntéze cysteinu, což je první stálý produkt zpracování síry (Ondřej & Drobník, 2002).

Těžké kovy můžeme rozdělit na esenciální – například železo, zinek, měď a jiné, a neesenciální, tedy rostlinám nepotřebné, kam bychom mohli řadit například rtuť nebo kadmium. Toxický vliv na organismus však u obou typů přichází s velmi malými koncentracemi. Kumulace těžkých kovů v půdě je nebezpečným ekologickým rizikem, neboť díky mikrobiální činnosti dochází ke zrychlení koloběhu prvků v půdě, ale také k vazbě a putování kovů potravním řetězcem.

Rostliny mají různé přirozené mechanismy, jak se s těžkými kovy vypořádat, avšak genetická manipulace přinesla perspektivu pro ekologii zkoumáním skupiny transgenů s geny pro vysoce specifické metalothioneiny, což jsou živočišné proteiny schopné pevné vazby s některými toxickými těžkými kovy. Mohou jednak bránit šíření iontů kovů z kořenů do rostliny, anebo kovy kumulovat v listech či plodech. Transgenní rostliny byly díky tomu schopné vázat například olovo nebo rtuť z půdy. Bylo by je tedy možné využít k čištění zeminy při rekultivacích, pokud by se po sklizni likvidovaly vhodným způsobem tak, aby se

těžké kovy již nevracely do půdy. Využití těchto rostlin však prozatím není zákonem schváleno (Řepková, 2013b).

3.2.7 Shrnutí

Ačkoliv otázky možných rizik a obav z pěstování GM plodin stále přetrvávají, celkové využívání těchto rostlin roste, neboť přináší vyšší zisk pěstitelům a zároveň vyšší užitkovou hodnotu. Většina GM plodin v dnešní době nese geny pro rezistenci vůči herbicidům nebo geny pro tvorbu bílkoviny Cry (dříve delta-endotoxin). Nejrozšířenějšími plodinami je sója, kukuřice a bavlník.

Transgenní rostliny představují do budoucna jednu z možných technologií, jak řešit zvyšující se nedostatek potravin, především vlivem vyšších nutričních hodnot potravin a krmiv. Díky odolnosti vůči škůdcům snižují spotřebu pesticidních ošetření a snižují tak enviromentální dopad. Zlepšují vlastnosti plodin pro průmyslové využití. Předpokládané nové plodiny by měly být schopny přežívat v extrémních podmínkách pro současné zemědělství nemožných – jako je sucho nebo zasolení (např. odolnost cukrové třtiny vůči suchu). Díky zvýšení produkce rostlinné hmoty jakožto obnovitelného zdroje, by se mohl řešit problém s pohonnými hmotami. Své uplatnění nacházejí také ve zdravotnictví při produkci vakcín a mnoha dalších látek.

3.3 Degradální plazmidy v boji proti polutantům

Jak již jejich název napovídá, jsou to takové molekuly, které přinášejí organismu schopnosti biologicky degradovat organické sloučeniny, a to především takové, které se přirozeně v přírodě nevyskytují. Tato kapitola bude věnována využití nejen mikroorganismů, ale dalších například rostlinných organismů při biodegradaci těchto toxických látek.

Biodegradace, v tomto případě také bioremediace, obecně znamená odbourávání organických látek – jedná se o jakýkoliv proces, při kterém dochází vlivem živých organismů nebo enzymů k odbourávání toxických nebo jiným způsobem rizikových látek na látky neškodlivé (Drobník, 2008). Úplnou biodegradací dochází k rozložení organických látek na anorganické sloučeniny, jakými jsou hlavně uhlík, dusík, fosfor, síra a jiné, které jsou již v prostředí přirozeně zařazovány do koloběhu prvků v přírodě. Úplný rozklad

původně toxické organické látky bychom proto mohli nazvat mineralizací. Tento proces je zcela přirozený a velmi prospěšný, neboť rovněž živočichové a rostliny jím přeměňují řadu organických látek.

Problémem však zůstává, že velká část syntetických sloučenin kontaminujících půdu a ovzduší, je škodlivá nejen pro živočichy a rostliny, ale také pro mikroorganismy, kteří tvoří nezastupitelné procento organismů schopných toxické látky odbourávat. Díky tomu nemusí dojít k úplné mineralizaci. Vlivem abiotických či biologických vlivů následně dochází k transformaci původních látek a tvorbě nových. Nejen, že ty se obvykle v přírodě hromadí a dlouhodobě udržují, ale po chemické a toxické stránce jsou neprozkoumané, a proto zůstává vliv jejich kontaminace a možná rizika neznámá. Nalezení odpovědí často vyžaduje nákladné chemické a ekotoxické analýzy (Horáková, 2006).

Biodegradace se samozřejmě netýká pouze látek zavlečených člověkem, ale i přírodních. Takovým látkám říkáme polutanty – látky znečišťující, odpadní. Polutanty jsou v Evropě mezinárodní úmluvou definovány jako látky, které splňují následující kritéria:

Vykazují toxicitu vůči člověku a životnímu prostředí, jsou přenášeny na větší vzdálenost, jsou obtížně rozložitelné a hromadí se v potravním řetězci, což souvisí především s jejich špatnou rozpustností ve vodě. Mezi nejzávažnější persistentní polutanty řadíme pesticidy – například 1,1,1-trichlor-2,2-bis (4-chlorfenyl) ethan, známější pod zkratkou DDT, uhlovodíky nebo polychlorované bifenylly, dibenzo-p-dioxiny nebo polycyklické aromatické uhlovodíky (Trögl, 2008).

Současně velmi diskutované téma – kontaminace životního prostředí plasty, herbicidy, pesticidy, ropnými produkty a jinými nepřírodními chemickými látkami, by mohlo nalézt své řešení právě ve využití genového inženýrství, neboť zapojení degradace toxických látek do metabolických drah bakterií či rostlin, je jediný přirozený proces recyklace těchto látek. Velké množství enzymů, které se různým způsobem podílí na rozkladu polutantů, je kódováno právě na plasmidech.

3.3.1 Mikroorganismy

Největší výhodou bakterií a jiných mikroorganismů je jejich obrovské množství a přítomnost v každém prostředí. Kromě půdy jsou rozkladné procesy zaznamenávány také v odpadních

vodách, skládkách, a dokonce v oceánech. Kromě toho se mikroorganismy velmi rychle množí a jsou schopny se adaptovat na změny prostředí. Vzhledem k těmto vlastnostem je přirozené, že hrají nezastupitelnou úlohu v koloběhu prvků v přírodě.

Celá řada mikrobů ve svých genech uchovává informace o rozkladných řadách některých polutantů. Na celkové degradaci organické látky se obvykle podílí větší množství různě zaměřených mikrobů, metabolit jednoho mikroorganismu je pak substrátem pro další organismy (Zihlová, 2013). Procesy mohou být jak anaerobní, tak aerobní. Rozklad může organismu přinášet užitek, například uhlík a energii, může být však rovněž bez užitku anebo dokonce vytvářet toxické meziprodukty (Trögl, 2008).

Bakterie

Zjevně nejzastoupenější organismy schopné degradace jsou bakterie. Často disponují celými rozkladnými drahami. Informace o nich jsou z menší části nesené na chromozomech, většinou jsou však kódovány na plazmidech. Výhoda spočívá v možnosti konjugace mezi bakteriemi často i nepříbuzného druhu, čímž jsou si bakterie navzájem schopné tyto údaje předávat. Příkladem může být plazmid pWWO, který nese informace o degradační dráze toluenu a jiných monoaromatických chemikáliích. Prvně byl objeven u kmene *Pseudomonas arvilla* odkud byl konjugací přenášen nejen do dalších pseudomonád, ale také do *E. Coli* (Zihlová, 2013). Tak je zprostředkováno šíření informací prostředím.

Další obrovská výhoda je neskutečně rychlá evoluce, jsou známé bakterie, které degradují látky používané a vytvořené teprve před desítkami let. Tato schopnost nejspíše souvisí s velmi rychlým rozmnožováním. Obvykle je evoluce založena na principu rozšíření stávající metabolické dráhy, rozšíření specifčnosti enzymu k určité látce či se vytvoří enzym, který je schopen spojit dvě oddělené metabolické dráhy (Trögl, 2008).

Hlavním záměrem genového inženýrství je nalézt bakterie schopné degradovat danou látku, izolovat ji, sledovat ekologické nároky degradačních procesů, a především nalezení a izolace genů za procesy zodpovědné. Tyto informace jsou využívány pro zlepšení bioremediačních technologií (Zihlová, 2013), Prvním degradačním plazmidem, který byl objeven, byl CAM plazmid schopný rozkládat kafr na isobutyryát, a to již v roce 1971. Nejskloňovanějším kmenem v rámci degradačních plazmidů, co se prozkoumanosti i degradační aktivity týče, je gramnegativní rod *Pseudomonas* (Košťál & Demnerová, 1999).

Uvedu některé plazmidy přirozeně přítomné v gramnegativních bakteriích schopné degradace organických látek:

Degradace n-alkanů a ropných produktů

Alkany, zastarale parafíny, jsou nasycené uhlovodíky bez násobných vazeb v uhlíkovém řetězci. Patří mezi alifatické sloučeniny, neboť neobsahují aromatické cykly. Alkany spolu s cykloalkany a aromatickými uhlovodíky tvoří nejpodstatnější složku zemního plynu a ropy.

Existuje více druhů plazmidů schopných degradovat alkany. *Pseudomonas putida* obsahuje plazmid OCT (z anglického octane plasmid), ten roste především na kratších alkanech, jakými mohou být například hexan, oktan nebo ethylbenzen. Jeho velikost je zhruba až 400 kb a jeho konjugační přenos probíhá jen velmi omezeně. Geny kódující využití n-alkanů nazýváme alk geny, kromě nich plazmid kóduje také toleranci k toxické koncentraci kationů rtuti a katabolismus D-lysinu. V *Pseudomonas* C12B byl nalezen plazmid pDEC. Geny přítomné na plazmidu přinášejí schopnost degradovat jednak středně dlouhé alkany (C₉-C₁₂), ale také alkeny (C₁₀, C₁₂). Jeho velikost byla odhadnuta na 200-300 kb, konjugační přenosy probíhaly mezi vlastními kmeny (Košťál & Demnerová, 1999).

S alkany úzce souvisí problémy s degradací ropy a ropných produktů. Surová ropa vzniká dlouhodobým procesem rozkladu organického materiálu bez přítomnosti kyslíku, jedná se o heterogenní směs tvořenou třemi frakcemi: alifatickou, aromatickou a asfaltickou. Dle výzkumů obsahuje až 20 tisíc různých druhů uhlovodíků od nevětvených alifatických až po polycyklické aromatické uhlovodíky. Ropa však může obsahovat další sloučeniny obsahující síru, dusík a fosfor, a dokonce i těžké kovy jako nikl nebo vanad. Složení ropy je však závislé především na místě jejího vzniku a její složení se tak mění dle místa nálezu (Bárta, 2013). Rovněž právě složení ropy určuje rychlost a vůbec možnost biodegradace, neboť zatím co lehká ropa je poměrně dobře rozložitelná, některé složky těžké ropy jsou pro mikroorganismy toxické, a tudíž jsou tyto produkty prakticky nedegradovatelné. Obecně lze tedy vyvodit závěr, že čím je větší molekulová hmotnost komplexních aromatických uhlovodíků, tím hůře bude látka podléhat biodegradaci a celková degradace surové ropy je téměř nemožná (Horáková, 2006).

Schopnost degradovat ropné produkty bakteriemi a jinými mikroorganismy byla objevena už v roce 1946. Jedná se o proces zahrnující obrovské množství bakteriálních kmenů, archeí či eukaryotních mikroorganismů, jejichž dílčí metabolické dráhy dokáží rozkládat různé ropné produkty na rozličné substráty, které mohou být využity dalšími organismy (Horáková, 2006). Většina rodů bakterií je přítomna ve všech typech prostředí, avšak v malém počtu. Populace prudce stoupá s přítomností ropných produktů. Mezi nejvýraznější zástupce bakteriálních kmenů schopných degradace ropy patří rody *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *57 Arthrobacter*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Candida*, *Rhodotorula* a *Sporobolomyces*. Důležité je však také zmínit houby, které v půdě mají větší vliv než některé zmíněné bakteriální kmeny, jedná se o *Penicillium* a *Cunninghamella* (Horáková, 2006).

Zajímavé jsou studie pojednávající o možné pomoci mikroorganismů při kontaminaci například při haváriích tankerů. Zatímco ropné skvrny na otevřeném moři člověku příliš nedovolují zasahovat, při znečištění pobřeží existují metody, jak bakteriální kultury zvýhodnit. Možnosti jsou dvě, jednak podpořit již vzniklou populaci bakterií v místě zamoření, anebo vysadit kulturu novou. Druhá možnost spočívá buď v odběru již přítomných bakterií a následném pomnožení v umělých podmínkách, nebo vyšetí úplně nové, čisté kultury. Tento postup však nevykazuje příliš příznivý účinek, neboť jak již bylo zmíněno, množství bakterií prudce vzroste po přítomnosti ropných látek, tudíž se velmi rychle stanou dominantní. Bakterie z laboratoře se musí přizpůsobit novým podmínkám a jiným živinám a velmi často je původní kolonie přeroste. Bylo však prokázáno, že dodáním životně nezbytných prvků jako je dusík a fosfor, může být proces rozkladu urychlen až v řádech dnů či týdnů (Bárta, 2013).

Degradace polychlorovaných bifenyly

Polychlorované bifenyly (dále jen PCB) jsou látky složené z bifenylového jádra s navázaným chlorem v různém počtu (1-10), (Totevová & kol., 1997). Rozmach těchto látek byl především v 30. letech 20. století v USA, odkud se šířily do zbytku světa. Ukončení využívání vzhledem ke škodlivým vlastnostem PCB probíhalo od konce 70. do poloviny 80. let (Kalač, 1992).

Jedná se o látky hydrofobní, rozpustné jsou především v organických rozpouštědlech, nejlépe v tucích. Jsou ohnivzdorné, inertní, mají značnou hustotu a vysoký elektrický odpor. Tyto vlastnosti jsou tím silnější, čím více je v molekule navázáno jednotek chloru. Jsou to látky velmi odolné vůči působení kyselin a zásad, redukci, hydrolýze a alkoholýze, nereagují ani s většinou oxidačních činidel. Tyto vlastnosti byly původně velmi ceněné a PCB se používaly jako transformátorové oleje, přísada nátěrových barev, laků, objevovaly se také v hydraulických zařízeních, či teplotnosných médiích. Byly náplní transformátorů, kondenzátorů, protipožárních stabilizátorů a jiných přístrojů. Rovněž však tyto vlastnosti úzce souvisí s velmi obtížnou a nákladnou likvidací PCB (Totevová & kol., 1997).

Za poměrně krátkou dobu používání PCB pronikly tisíce tun této látky do prostředí. Původní tvrzení o neškodlivosti těchto látek byla vyvrácena v 60. letech, kdy bylo zjištěno, že PCB pronikají do potravního řetězce a kumulují se v tkáních organismů, a to nejen u predátorů, ale také v mléce a dalších živočišných produktech. Dělo se tak především proto, že PCB se jako nátěrové produkty často využívaly v silech a kravínech, kudy také pronikaly do krmiv a hromadily se v tělech dobytka. Teprve později bylo zjištěno, že se jedná nejen o perzistentní látku se schopností bioakumulace, ale také látku karcinogenní (Kalač, 1992). Toxicita PCB stoupá se stupněm chlorace a také polohou, ve které se chlor na bifenylovém jádře nachází. Nejtoxikčtější jsou sloučeniny s chlorem v meta a para poloze (Totevová & kol., 1997). PCB jsou navíc lehce přenášeny vzduchem a jejich přítomnost byla zjištěna až na Antarktidě či Arktidě (Kalač, 1992). Zajímavé, ale hlavně také poměrně znepokojující je tvrzení doktora Ivana Holoubka, podle nějž mají české ženy v mateřském mléce nejvíc polychlorovaných bifenyly z celé Evropy (ČT 24, 2010).

Biodegradace PCB v prostředí je stále aktuálním tématem. První publikace o utilizaci bakterií na monochlorbifenylech popsali Ahmed a Focht (1973) v 70. letech. Studie se týkala dvou kmenů bakterie *Achromobacter*, která dokázala degradovat 4-chlorbifenyly a 4,4'-dichlorbifenyly a získávat z nich uhlík.

Dráhy, kterými lze štěpit PCB na další produkty se zásadně liší, jedná-li se o aerobní a anaerobní prostředí. Anaerobní cestou dochází k dechloraci více substituovaných molekul v polohách para a meta, čímž se snižuje stupeň toxicity a dochází ke shromažďování molekul s chlorem v ortho poloze a také mono, di a trichlorbifenyly. Aerobní bakterie přímo napadají

bifenylovou kostru méně substituovaných sloučenin, čímž produkují chlorbenzoové a 5-C chloralifatické kyseliny. Cesta degradace tohoto typu má tři dráhy:

1. Metabolismus bifenyly a kometabolismus (enzymy přeměňují strukturně podobnou látku přirozenému substrátu enzymu, která však nepřináší užitek pro organismus) PCB na chlorbenzoáty a 5-C chloralifatické kyseliny
2. Degradace chlorbenzoátů
3. Dehalogenace 5-C chloralifatických kyselin

Schopnost odbourávat PCB mají následující bakteriální kmeny – *Alcaligenes Y42*, *Acinetobacter P6* a *Pseudomonas sp.LB400*.

Z pokusů a experimentů vyvodil Furukawa následující závěry:

- Schopnost odbourávat PCB je závislá na stupni chlorace. Čím více substituentu, tím klesá schopnost biodegradace.
- Přeměna nesubstituovaných kruhů je rychlejší než transformace sloučenin se substitucí na obou kruzích.
- Iniciační oxidace zpravidla začíná na méně substituovaném jádře.

Enzymy podílející se na degradaci PCB jsou bifenyl-2,3-dioxygenasa, u *Alcaligenes eutrophus H850* a *Pseudomonas sp.LB400* se jedná o bifenyl-3,4-dioxygenasa. Biodegradace je ovlivněna především uspořádáním a polohou atomů chloru, které rozhodují nejen o rychlosti reakce, ale také o možné rezistenci k biodegradaci.

Důležité je také poznamenat, že geny kódující tyto enzymy nejsou přítomny v jedné bakterii, biodegradace PCB je proto výsledkem směsné kultury kmenů, které vzájemně kooperují. Cílem genového inženýrství bylo proto vytvořit kmen s kompletním genovým vybavením (Totevová & kol., 1997).

Degradace toluenu

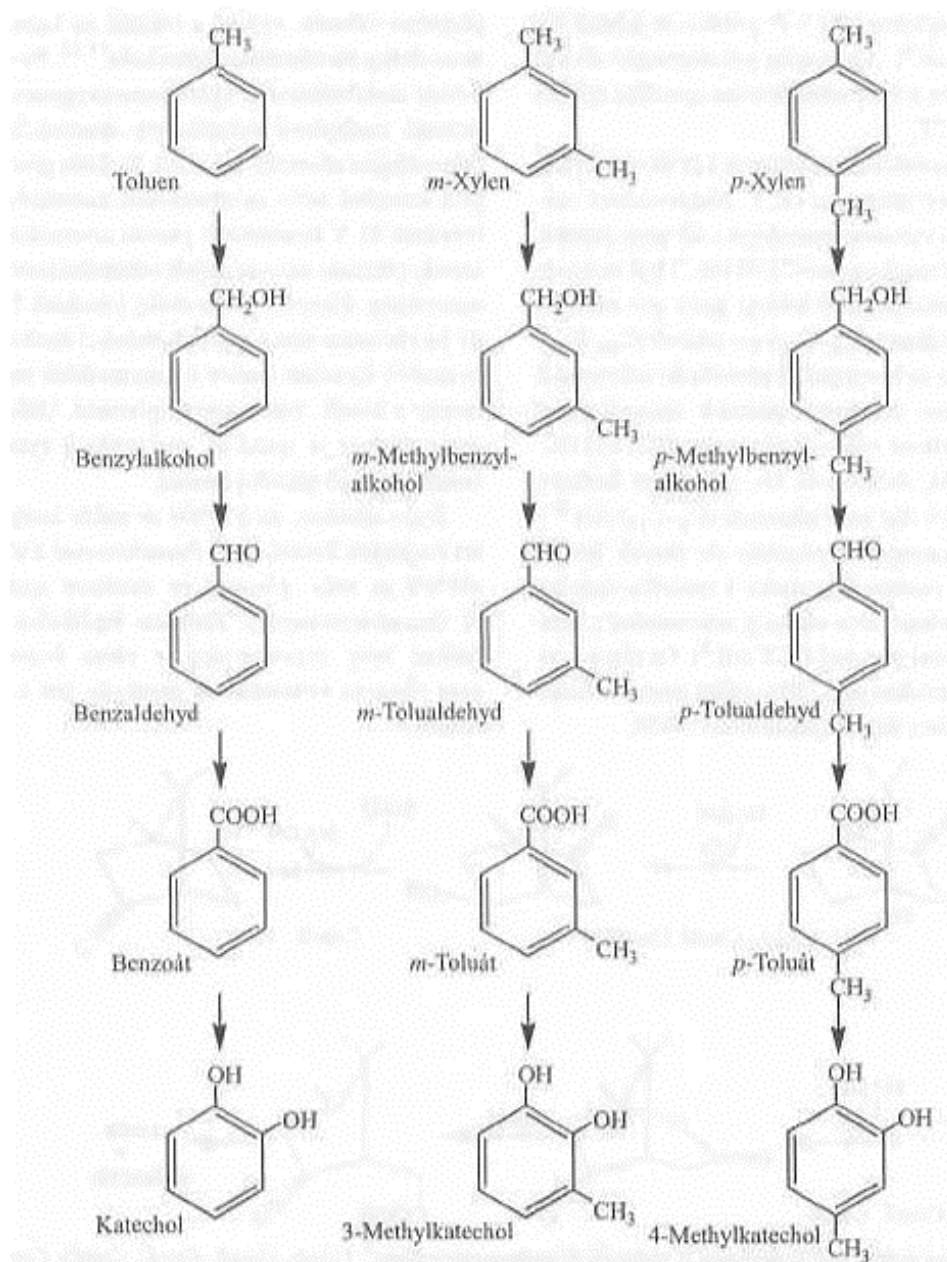
Methylbenzen, triviálním názvem toluen, je bezbarvá, ve vodě nerozpustná těkává kapalina. Patří mezi aromatické uhlovodíky. Jeho páry v kombinaci se vzduchem vytváří třaskavou směs, je zdraví škodlivý. Využití nalézá především jako rozpouštědlo barev a laků, při výrobě jiných sloučenin, kupříkladu trhaviny trinitrotoluenu (TNT).

Skupina plazmidů schopná utilizace toluenu dokáže obvykle degradovat také xylen a m- a p-toluát. Prvním objeveným plazmidem byl tzv. TOL plazmid, avšak vzhledem k pozdějšímu objevu dalších plazmidů podobných vlastností byl tento název použit pro celou skupinu a první původní plazmid byl nazván pWWO.

Plazmid pWWO byl objeven v bakterii *Pseudomonas arvilla mt-2* a nese všechny zmíněné geny, které přináší informace o enzymech pro přeměnu toluenu, xylenů a toluátů na katechol, dále pak katalyzátory reakcí zpracování katecholu, kterým je xylenmonooxygenáza (xylA), která oxiduje methylové zbytky benzenového jádra na

odpovídající alkoholy. Následně jsou hydroxyderiváty rozkládány přes katechol nebo substituované katecholy meta dráhou. Existuje také rychlejší ortho dráha, avšak ta je kódována na chromozomech (Košťál & Demnerová, 1999).

Jak již bylo zmíněno, plazmid pWWO se konjugací přenáší nejen do dalších kmenů *pseudomonas*, ale také do *E.Coli*, do které však nepřenáší všechny své funkce. Z různých bakterií bylo izolováno množství dalších plazmidů, které byly označeny pWW1-pWW21. Ty nesou podobné geny, liší se však svou velikostí (Košťál & Demnerová, 1999).



Obr. 10: Degradací dráha toluenu, m-xyleny, p-xyleny (převzato z: Košťál & Demnerová, 1999, s. 130)

Degradace naftalenu

Naftalen, dříve naftalín, je bílá, krystalická látka tvořena dvěma benzenovými jádry, což z něj činí nejjednodušší polycyklický uhlovodík. Naftalín je zdraví škodlivá, těkavá, hořlavá a slabě narkotická látka. Jeho převodem ftalanhydrid mohou vznikat důležité látky, jakými

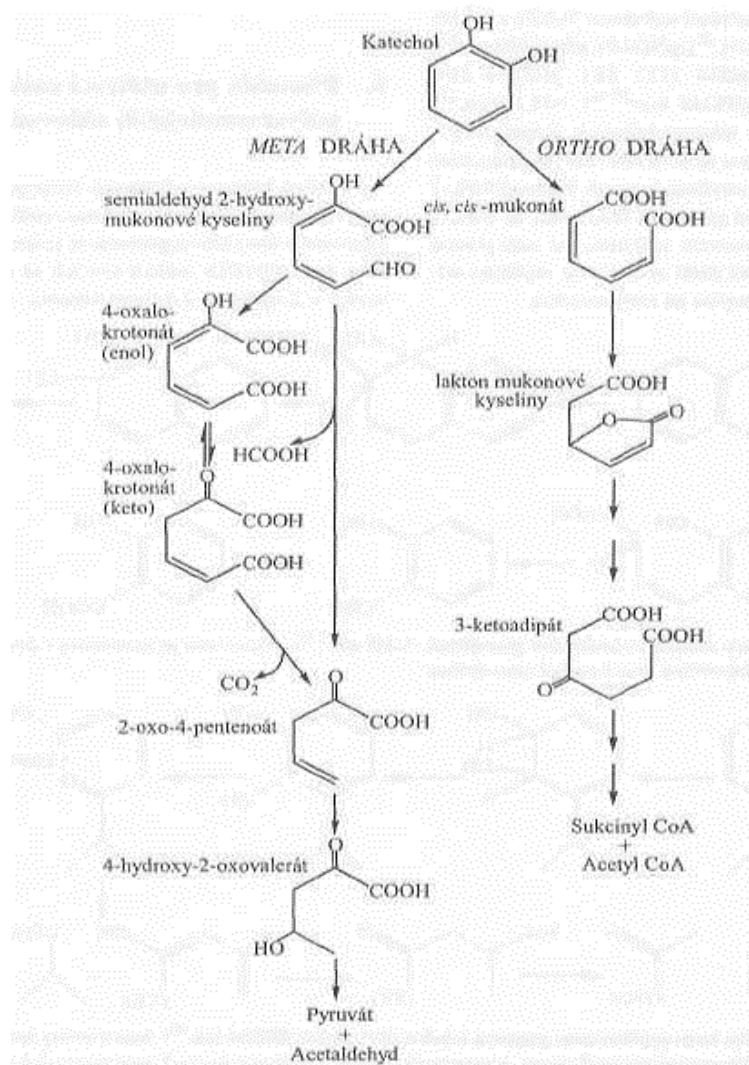
jsou například plasty, barviva, rozpouštědla a další. Samotný naftalen se využívá jako dezinfekce, dříve také k hubení molů.

První bakterií, která byla schopná růst na naftalenu, byla *Pseudomonas putida* PpG7, jejíž plazmid bych nazván NAH, později k němu byla přidána číslice 7, neboť podobných plazmidů je více. Degradční dráha štěpí naftalen až na katechol, který je dále odbouráván meta anebo ortho dráhou popsanou v bodě 2. Geny kódující odpovídající enzymy nacházíme na dvou operonech *nah* a *nah2*, které jsou od sebe odděleny oblastí velkou asi 7 kb. Důležitý, leč neobjasněný poznatek se týká inhibice růstu některých druhů bakterií, které obsahují plazmid NAH7 a jsou vystaveny teplotám nad 41 °C. Bylo dokázáno, že plazmid se konjugálně přenáší do testovaných kmenů *P. putida* (Košťál & Demnerová, 1999).

Degradace 1,2 – dichlorethanu

1,2 – dichlorethanu je nebezpečná svými karcinogenními, těkavými a toxickými účinky. Radíme ji mezi chlorované organické látky. Své uplatnění nachází především jako výchozí surovina při výrobě vinylchloridu, ze kterého se získává polyvinylchlorid (PVC). Ačkoliv je ve vzduchu poměrně stabilní, podílí se na tvorbě fotochemického smogu, v půdě je odbourávána jen velmi pomalu.

Cestu degradace kódují gen *dhlA* bakterie *Xanthobacter autotrophicus* GJ10. Geny nese plazmid pXAU1a přináší tak informace o enzymu haloalkandehalogenáza. Ta dokáže štěpit 1,2 – dichlorethan na 2 - chlorethanol, a přes degradační dráhu pokračuje rozklad přes 2 - chloracetát a glykolát. Poslední uvedený krok je katalyzován enzymem haloalkanoátdehalogenazou, kódovanou genem *ald* (Košťál & Demnerová, 1999).



Obr. 11: Ortho a meta dráhy odbourávání katecholu (převzato z: Košťál & Demnerová, 1999, s. 131).

Degradace plazmidy grampozitivních bakterií

Významné plazmidy grampozitivních bakterií mají tu nevýhodnou vlastnost, že většina z nich nepodléhá cyklizaci, ale vyskytují se jako lineární molekuly. Jsou proto velmi křehké a jejich izolace a celkově práce s nimi je poměrně složitá a odpovídá námaze nutné k izolaci například eukaryotních chromozomů. Zároveň je u některých kmenů obtížné rozrušovat buněčnou stěnu. Tyto typy plazmidů přinášejí nejen informace o degradačních drahách a katabolismu, ale také například produkci antibiotik (Košťál & Pazlarová, 1999).

Rozhodně stojí za zmínku lineární megaplazmid RHA1 přítomný v bakterii *Rhodococcus sp.*, neboť enzymy kódované geny *bphACB* a *bphDEF* přítomnými na plazmidu, jsou zodpovědné za oxidaci bifenyly přes katechol. Problematika PCB byla popsána v kapitole Degradace polychlorovaných bifenyly.

Další lineární molekula, plazmid pBD2, byl nalezen uvnitř bakterie *Rhodococcus erythropolis* BD2. Dovoluje mikroorganismu využívat isopropylbenzen a využívat jej jako zdroj uhlíku a energie. Triviálním názvem kumen je aromatický uhlovodík, tvořící složku surové ropy i rafinovaných paliv. Počáteční enzym spouštějící degradační dráhu je isopropylbenzendioxygenasa, která převádí isopropylbenzen na 3-isopropylkatechol. Kromě toho však plazmid kóduje schopnost růstu na propylbenzen, ethylbenzen, toluenu a trichlorethenu a také rezistenci k těžkým kovům arsenu a rtuti (Košťál & Pazlarová, 1999). Plazmid kmene *Rhodococcus* TE1 nese geny *eptA* pro degradaci EPTC (s-ethyl-N,N-dipropylthiokarbamát) a *atrA*, které dealkylují atrazin (2-chlor-4-ethylamino-6-isopropylamino-5-triazinu), avšak také deriváty s-triazinu, kterými jsou propazin, simazin a cyanazin. Všechny jmenované látky se používají jako syntetické herbicidy a třebaže člověku nejsou příliš škodlivé (ačkoliv atrazin je řazen mezi potenciální karcinogeny), ohrožují správnou hormonální funkci některých obojživelníků a mohou být toxické zvířatům. V prostředí jsou velmi stálé (Patočka, 2007).

Bakterie se tedy dají využívat jako efektivní rozkladači látek kontaminujících prostředí, při ropných haváriích nebo čištění odpadních vod. Za zmínku určitě také stojí vazba těžkých kovů, neboť tato vlastnost by mohla být dále využitelná kupříkladu u GM rostlin. Samozřejmě i u bakterií se nabízí možnost vylepšit dané organismy genovým inženýrstvím, například sloučit jednotlivé degradační dráhy více bakterií do jednoho kmene. Nicméně využití geneticky modifikovaných bakterií má svá úskalí, a to především v horizontálním přenosu genů do jiných organismů a v časté snížené životaschopnosti organismů vložením cizorodé informace. Kontrola GMO je značně složitá a vzhledem k přísným zákonům v polních podmínkách prakticky nevyzkoušená (Zihová, 2013).

Houby

Jak již bylo zmíněno, také houby se uplatňují při rozkladu organických látek. Největší podobnost s mechanismy bakteriálních organismů byla nalezena u kvasinek, avšak jejich degradační cesty nejsou zdaleka tak prozkoumané jako dráhy bakterií.

Zajímavé jsou však i jiné houby, především dřevokazné a saprotrofní. Tyto organismy dokáží do svého okolí uvolňovat lignolytické enzymy (štěpí lignin či celulózu), schopné štěpit polymerní organické látky, které se přirozeně vyskytují v přírodě. Jelikož tyto enzymy jsou schopny reagovat s variabilnějšími látkami, dají se využít i k degradaci některých umělých látek, jakými jsou polyaromatické uhlovodíky či některé druhy plastů. Rozklad se tak děje mimo buňky houby (Trögl, 2008).

3.3.2 Rostliny

Takzvaná fytoremediace je označení pro biologickou degradaci či akumulaci toxických nebo kontaminačních látek z prostředí v rostlinách. Aby mohlo k odstranění polutantů docházet, musí být kontaminanty přístupné z vody a půdy do rostliny. Dostupnost je dána především rozpustností látky, druhem půdy a stářím znečištění. Myšlenka očisty je realizována vysetím či vysázením rostliny na kontaminovaných místech, po následném navázání polutantů je rostlina sklizena a zpracována vhodnými tepelnými, mikrobiálními či chemickými postupy (Ondřej & Drobník, 2002).

Metoda fytoextrakce se zaměřuje především na akumulaci těžkých kovů v rostlině. Existují druhy téměř rezistentní k přítomnosti těžkých kovů v půdě, navíc odolné k ukládání kovů ve vysokých koncentracích do svých pletiv bez vážnějších účinků na růst či vitalitu rostliny. Těmto rostlinám říkáme hyperakumulátory. Uplatňují se především v místech, kde je koncentrace kovů v půdě větší. Příkladem takové rostliny může být *Thlaspi caerulescens* z rodu hořčic (Vaněk & kol.). Zajímavé je také použití těchto aplikací při prospekci kovů v půdě (Drobník, 2008). Možnost genové manipulace a zlepšení vlastností organismu je na místě, neboť vysoké koncentrace těžkých kovů v prostředí jsou současným problémem. Více o této možnosti bylo uvedeno v kapitole 3.2.6. Transgenozní geny pro toleranci ke stresu.



Obr. 12: *Thlaspi caerulescens* (Penízek modravý)¹³

Rhizofiltrace je další možností, jak využívat rostlin při absorpci xenobiotik z prostředí. Využívá se především kořenů živých rostlin, kolem kterých dochází k proudění znečištěné vody. I tato metoda může být využita při zachytávání těžkých kovů, ale v nízkých koncentracích, vhodná je také pro zachycení radionuklidů. Tato schopnost byla zaznamenána u rostlin *Brassica juncea* nebo *Helianthus annuus*. Předpokládá se, že tento postup by byl velmi výhodný při čištění vod (Vaněk & kol., 2002).

Fytodegradace je schopnost rostliny odbourávat polutanty, často však s přispěním mikroorganismů. Jedná se o metodu založenou na mechanismu přeměny látek na různé substráty, které mohou využívat jiné organismy. U rostlin se jedná především o mechanismy enzymatické, zapojené do detoxikačních reakcí. Systém je založen na spolupráci, kdy rostliny svými kořeny vylučují do okolí kořenů množství látek, které mohou obsahovat například sacharidy, aminokyseliny a nejrozličnější organické látky, které slouží jako zdroj energie pro mikroorganismy nacházející se v blízkosti kořenových svazků. To umožňuje růst mikrobiální populace. Mikroby zase svými drahami připravují látky, které si rostlina neumí připravit sama (Vaněk & kol., 2002).

¹³ Dostupné online: <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/6/62/Gebirgs-Hellerkraut.jpg>, [cit. 2017-12-01]

Fytodegradace byla dosud využita na nejrozumnější typy znečištění, mimo jiné při remediaci ropných látek, polyaromatických uhlovodíků, PCB, pesticidů, výbušnin a jiných nitrosloučenin či detergentů (Vaněk & kol., 2002).

Fytovolatilizace je schopnost GM rostlin redukovat rtuťnaté ionty na kovovou rtuť. Tato schopnost je vlastní některým mikroorganismům, začleněním odpovídajícího genu do genomu rostliny *Arabidopsis thaliana* a také *Lyriodendron tulipifera* bylo možné produkovat u těchto organismů reduktázu rtuti. Tím byla zvýšena tolerance těchto rostlin na jinak toxickou koncentraci rtuťnatých iontů v jejich pletivech a zároveň je převádět do formy kovové rtuti. Ta se díky svým fyzikálním vlastnostem uvolňuje do okolí v podobě par. Velké úskalí proto nastává v realizaci opatření, aby nedocházelo k masivnímu uvolňování plynných zplodin najednou (Vaněk & kol., 2002).

4 Diskuze

Téma geneticky modifikovaných organismů obecně je velmi kontroverzní. Objevuje se řada názorů, které zásahy člověka do přírody kritizují pro obavy z následků, které by mohl ukázat až čas, z etických, ekologických a dalších rizik. Častým argumentem především náboženských hnutí je právě neetický způsob, jakým člověk zasahuje do něčeho, co stvořil bůh. Běžným problémem je také neinformovanost, protože při čtení různých článků souvisejících s tématem jsem narazila na otázky, jestli je možné geneticky upravenou potravinou ohrozit vlastní DNA a podobně. Tyto obavy jsou samozřejmě poněkud naivní. Ukázkou může být například mediální poprask kolem výzkumného týmu veterináře Federica Infasceliho, jehož závěry o škodlivosti GMO, které vzbudily obavy italské veřejnosti, se ukázaly jako zfalšované¹⁴. Reálný problém pro mě představuje možnost křížení geneticky modifikovaných a běžných organismů, avšak tomu by měl zabráňovat zákon o nakládání s geneticky modifikovanými organismy a genetickými produkty (zákon č. 78/2004 Sb), dohledatelný například na webových stránkách ministerstva životního prostředí¹⁵. Naopak, jak připomíná Vladimír Vondřejš (2010), opět se ukazuje neinformovanost některých odporových organizací, neboť v USA byly zaznamenány případy, kdy aktivisté vnikli a zničili výzkumný pozemek, čímž samozřejmě vzrostlo nebezpečí rozšíření organismů v rámci testování, které mohly být potenciálně hrozbou. Častým argumentem je také vznik superplevelů, tímto tématem jsem se však již zabývala v kapitole o toleranci k herbicidům (viz kapitola 3.2.1).

Řada renomovaných vědců, mezi nimi například prof. RNDr. Jaroslav Drobník, DrSc naopak biotechnologie podporuje jako hudbu budoucnosti, kterou by bylo možné řešit neskutečné množství problémů šetrným, a hlavně levným tudíž dostupným způsobem. Předpoklady, jak by se plazmidy a jejich integrace do jiných organismů daly využít, jsou fascinující, avšak jistým způsobem znepokojivé. Klady i zápory GMO dle mého názoru

¹⁴ Dostupné online: <http://www.osel.cz/8654-v-italii-vysetruji-zavazne-podvody-ve-vyzkumu-skodlivosti-gmo.html>

¹⁵ Dostupné online:

<http://www.mzp.cz/www/platnalegislativa.nsf/d79c09c54250df0dc1256e8900296e32/538509b51d97a94fc125690b00263a23?OpenDocument>, [cit. 2017-04-10]

střízlivě zpracoval také například Prof. Ing. Jaroslav Petr, DrSc. ve článku Proč se bojíme modifikovaných plodin? Rajčata nám chutnala¹⁶.

Na začátku zpracování mé práce jsem neměla jasno, jaký názor na tuto problematiku vlastně mám, a bohužel jsem k jednoznačnému závěru nedošla ani v závěru své práce. Ačkoliv se mě mnohé publikace snažily ujistit, že rizika jsou minimální, přikláním se k té možnosti, že to opravdu ukáže až čas. Obecně jsem toho názoru, že kde je možnost použití, tam bude i možnost zneužití. Ukazuje se tu pak druhá strana mince, kterou je hrozba bioterorismu a biologické války. Avšak vzhledem k dostupnosti a lacinosti zbraní normálních nejsou biologické útoky nepravděpodobné, tím spíše geneticky modifikované. Také obavy ze špatné kombinace genů, čímž by mohl vzniknout toxický, karcinogenní nebo jinak nebezpečný produkt, jsou dle mého názoru oprávněné, protože ačkoliv experimenty podléhají přísnému testování, věřím, že tato možnost by mohla nastat.

Na druhé straně spatřuji v genovém inženýrství obrovský potenciál, jak by se dostupným způsobem daly řešit globální problémy, které doposud nenalezly uspokojivé anebo časově proveditelné řešení. Vedle tragické situace v rozvojových zemích s nedostatkem jídla a lékařské péče, bych vyzdvihla hlavně likvidaci organických látek v životním prostředí, jakými jsou ropa, PCB ale také docela obvyčejné a hojně rozšířené pesticidy.

Protože možností využít plazmidy v různých odvětvích je nepřeberné množství, řadou z nich jsem se nezabývala, avšak například zlepšení vlastností řepky, která by se využívala jako obnovitelný zdroj pohonných paliv, je velmi zajímavý nápad. Bt a Ht řepky již byly vytvořeny, bohužel jejich pěstování je v EU zakázáno. Také výroba bioplynu z odpadu je slibné téma (Vondrajs, 2010).

Z publikací jsem se dozvěděla také o zajímavých hypotézách a potenciálních možnostech využití plazmidů hlavně v genové terapii, kterou by bylo možné „opravovat“ defekty vzniklé na DNA, nahrazovat poškozený gen nepoškozeným, a tudíž léčit některé dědičné choroby. Vladimír Vondrejs (2010) však poukazuje na to, že experimenty probíhají pouze u pacientů ve velmi těžkém stavu a terapie pak není úspěšná. Existuje však domněnka, že genová terapie v raných stádiích onemocnění by měla být úspěšná. Tyto metody nalézají uplatnění například

¹⁶ Dostupné online: http://technet.idnes.cz/geneticky-modifikovane-plodiny-dn2-/veda.aspx?c=A131216_122147_veda_mla

při různých druzích léčby rakoviny, jakými jsou například posílení imunity, zvýšení odolnosti kmenových buněk anebo aplikace tzv. sebevražedných genů, které jsou zaváděny přímo do nádoru. Vedle toho lze velkou řadu těžkých onemocnění léčit podáním některých chybějících proteinů, které mohou produkovat levně a dostupně mikroorganismy, jako je tomu například u lidského inzulinu, který je i u nás (v ČR) produkován bakteriemi nebo kvasinkami.

Dle mého názoru řada lidí není s problematikou dostatečně seznámena, a proto vyvozuje nesprávné závěry. Samozřejmě tím nechci říct, že kritizovat GMO je něco špatného a hloupého, pouze jsem se sama setkala s tím, že většina lidí v mém okolí nemá tušení, jaké jsou postupy, legislativa, ochrana a podobně.

5 Závěr

Díky dříve nabytým poznatkům z praktické práce s konstrukcí plazmidového vektoru (Semencová, 2013), jsem byla schopná pochopit, a hlavně si vlastnoručně zkusit všechny výše uvedené metody tvorby rekombinantní DNA. Ve své bakalářské práci jsem tedy mohla shrnout základní informace o plazmidech a upozornit na jejich využití v genovém inženýrství. Dále jsem popsala jednu z hlavních metod genového inženýrství, která plazmidy využívá, a tou je rekombinace *in vitro* neboli DNA klonování.

Druhou část mé práce tvořily jednotlivé příklady ze současných biotechnologií, které by člověku mohly přinést až neskutečné výhody, ať už se jedná o řešení situace s nedostatkem potravin v rozvojových zemích, snahy o napravení škod při kontaminaci životního prostředí organickými sloučeninami nebo získávání farmakologicky důležitých látek.

6 Seznam použitých informačních zdrojů

Knihy

1. Vondrejs, Vladimír (2010). *Otazníky kolem genového inženýrství*. Praha: Academia, Průhledy (Academia). ISBN 978-80-200-1892-2.
2. Štípek, Stanislav (1997). *Stručná biochemie: uchování a exprese genetické informace*. Praha: Medprint, Učební texty (Medprint). ISBN 80-902-0362-0.
3. Šifner, František, & kolektiv (1998). *Vybrané kapitoly z biotechnologií pro studující učitelství biologie a ekologické výchovy*. Praha: Karolinum, ISBN 80-718-4731-3.
4. Ganong, William, F. (1995). *Přehled lékařské fyziologie*. Jinočany: H, ISBN 80-857-8736-9.
5. Drobník, Jaroslav (2008). *Biotechnologie a společnost*. Praha: Karolinum, ISBN 978-80-246-1484-7.
6. Ondřej, Miloš, & Jaroslav, Drobník (2002). *Transgenoze rostlin*. Praha: Academia, ISBN 80-200-0958-2.
7. Custers, René (2006). *Průvodce biotechnologiemi: biotechnologie v zemědělství a potravinářství*. Praha: Academia, ISBN 80-200-1350-4.
8. Hořejší, Václav, & Jiřina, Bartůňková (2009). *Základy imunologie*. 4. vyd. Praha: Triton, ISBN 978-80-7387-280-9.
9. Procházka, Stanislav (1998). *Fyziologie rostlin*. Praha: Academia, ISBN 80-200-0586-2.
10. Horáková, Dana (2006). *Bioremediace*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, ISBN 80-708-0416-5.
11. Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & P., Walter *Základy buněčné biologie: Úvod do molekulární biologie buňky*. Ústí nad Labem: Espero Publishing, 1998. ISBN 80-902906-02-0.
12. Klaban, Vladimír (2005). *Ilustrovaný mikrobiologický slovník*. 1. vyd. Praha: Galén, 2005, 654 s. ISBN 80-726-2341-9.
13. Vondrejs, Vladimír (2011). *Genové inženýrství IV*. Praha: Karolinum, ISBN 978-80-246-1919-4.

14. Brown, T. A. (2007). *Klonování genů a analýza DNA: úvod*. V Olomouci: Univerzita Palackého, ISBN 978-80-244-1719-6.
15. Rédei, G., P., (2008). *Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics, and Informatics*. 3rd Edition. vyd. [s.l.] : Springer, ISBN 978-1-4020-6753-2.
16. Nicholl, D., S., T., (2008). *An Introduction to Genetic Engineering*. 3. vyd. [s.l.] : Cambridge University Press.
17. Lee, S., Y., (2009). *Systems Biology and Biotechnology of Escherichia coli*. Springer, ISBN 978-1-4020-9393-7.
18. Ruml, Tomáš, Rumlová, Michaela, & Václav Pačes (2002). *Genové inženýrství*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2002. ISBN 80-708-0499-8.
19. Sambrook, Joseph, & David, Russell (2001). *"Chapter 1". Molecular Cloning - A Laboratory Manual. 1* (3rd ed.). p. 1.27. ISBN 978-0-87969-577-4.
20. Votava, Miroslav (2001). *Lékařská mikrobiologie obecná*. Brno: Neptun, ISBN 80-902-8962-2.
21. Kalač, Pavel (1992) *Organická chemie – Přírodní a kontaminující látky*. Jihočeská univerzita 1992, ISBN 80-85645-01-7
22. Nečas, Oldřich (2000). *Obecná biologie pro lékařské fakulty*. 3. vydání. Jinočany: H+H, ISBN 80-86022-46-3.

Elektronické periodikum

1. Drobník, Jaroslav (2010). Inzulin a historie vědy. *Vesmír*, 89, 632. Dostupné z webu <http://casopis.vesmir.cz/abstrakt/inzulin-a-historie-vedy>
2. Čeřovská, Noemi (2012). Vakcíny pěstované v rostlinách. *Vesmír*, 91, 594. Dostupné z webu <http://casopis.vesmir.cz/clanek/vakciny-pestovane-v-rostlinach>
3. Špížek, Jaroslav (1999). Rezistence na antibiotika. *Vesmír*, 78, 27. Dostupné z webu <http://casopis.vesmir.cz/clanek/rezistence-na-antibiotika>
4. Černý, Jan (2009). Zelený fluorescenční protein. *Vesmír*, 88, 228. Dostupný z webu <http://casopis.vesmir.cz/clanek/zeleny-fluorescencni-protein>
5. Košťál, Jan, & Kateřina, Demnerová (1999). Degradční plasmidy gramnegativních bakterií. *Chemické listy*, 93, 128-137. Dostupné z webu http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/1999_02_128-137.pdf

6. Totevová, S., Prouza, M., Brenner, V., & K., Demnerová (1997). Bakteriální degradace PCB. *Chemické listy*, 91, 858-866. Dostupné z webu http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/1997_10_858-866.pdf
7. Košťál, Jan, & Kateřina, Demnerová (1999). Degradční plasmidy gramnegativních bakterií. *Chemické listy*, 93, 128-137. Dostupné z webu http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/1999_02_128-137.pdf
8. Košťál, Jan, & Jarmila, Pazlarová (1999). Plasmidy pro degradaci xenobiotik u grampozitivních bakterií. *Chemické listy*, 93, 196 - 200. Dostupné z webu http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/1999_03_196-200.pdf
9. Bevan, M. W., Flavell, R., B., & M., D., Chilton (1983). A chimaeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. *Nature*, 304, s. 184–187. DOI:10.1038/304184a0
10. Cressey, Daniel. Widely used herbicide linked to cancer. *Nature* [online]. 2015 [cit. 2017-03-07]. Dostupné z webu <http://www.nature.com/news/widely-used-herbicide-linked-to-cancer-1.17181>
11. Luo, D., & W.,M., Saltzman. Synthetic DNA delivery systems. *Nat. Biotechnol.* 18 (1):33–7[online]. 2000 [cit. 2017-03-07]. Dostupné z webu http://www.nature.com/nbt/journal/v18/n1/full/nbt0100_33.html

Elektronický článek

1. Trögl, Josef. *Biodegradace* [online]. 2008 [cit. 2017-03-07]. Dostupné z webu <http://fzp.ujep.cz/~trogl/1Mikr11Biodegradace.pdf>
2. Hluska, Tomáš. *Šikimátová dráha* [online]. 2009[cit. 2017-03-07] Dostupné z webu <http://www.biolib.cz/cz/glossaryterm/id4789/>
3. Štefánek, Jiří. *Otrava aflatoxinem* [online]. 2011 [cit. 2017-03-07] Dostupné z webu <http://www.stefajir.cz/?q=otrava-aflatoxinem>
4. Řepková, Jana (2013a). *Geneticky modifikované rostliny* [online]. [cit. 2017-03-07].Dostupné z webu

- <https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/js13/genetika/web/pages/09-geneticke-modifikace.html>
5. Řepková, Jana (2013b). *Odolnost rostlin k abiotickým stresovým faktorům* [online]. [cit. 2017-03-07]. Dostupné z webu <https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/js13/genetika/web/pages/08-rezistence-k-abiotickym-faktorům.html>
 6. Grycová, Lenka. *Syntetický auxin 2,4 - D – jeho využití v zemědělství a vliv na modelovou suspenzi BY-2* [online]. 2012 [cit. 2017-03-07]. Dostupné z webu <http://www.chempoint.cz/synteticky-auxin-2-4-d>
 7. Bárta, Jiří. *Nabídnou nám mikroorganismy pomocnou ruku při likvidaci ropných havárií?* [online]. 2013 [cit. 2017-03-07]. Dostupné z webu <http://www.gate2biotech.cz/nabidnou-nam-mikroorganismy-pomocnou-ruku-pri-likvidaci-ropnych-havarii/>
 8. Vaněk, T., Soudek, P., Tykva, R., & I., Kališová. *Možnosti využití fytořemediace pro odstranění kontaminace způsobené toxickými kovy a radionuklidy* [online]. 2002 [cit. 2017-03-07] Dostupné z webu http://slon.diamo.cz/hpvt/2002/sekce/zahlazovani/Z07/P_07.htm
 9. Patočka, Jiří. *Toxikologie atrazinu* [online]. 2007 [cit. 2017-03-07] Dostupné z webu <http://www.toxicology.cz/modules.php?name=News&file=article&sid=97>
 10. ČT 24. *Vědci v Brně prozkoumají souvislost prostředí s nemocemi* [online] 2010 [cit. 2017-03-07] Dostupné z webu <http://www.ceskatelevize.cz/ct24/ct24/domaci/1363124-vedci-v-brne-prozkoumaji-souvislost-prostredi-s-nemocemi>
 11. Kodíček, Milan. *Výkladový slovník biochemických pojmů* [online] 2004 [cit. 2017-03-07] Dostupné z webu http://147.33.74.135/knihy/uid_es-002_v1/motor/main.obsah.html
 12. Bártová, Eva. *Gelová elektroforéza* [online] 2011 [cit. 2017-03-07] Dostupné z webu https://cit.vfu.cz/opvk2011/?title=popis_metod-gelova_elektroforeza&lang=cz

13. Soukup, Aleš. *Fluorescenční mikroskopie*. [online]. 2004 [cit. 2017-03-08]. ISSN 18046517. Dostupné z webu
<http://kfrserver.natur.cuni.cz/studium/prednasky/mikro/mscope/fluor/fluor.htm>
14. Ahmed, A., & D., D., Focht (1973). *Degradation of polychlorinated biphenyls by two species of Achromo-bacter*. Can .J. Microbiol. Dostupné z webu
<http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/m73-007?journalCode=cjm>

Ostatní zdroje

1. Lorenc, František (2011). *Rostlinné peptidy a proteiny s antimikrobiální aktivitou a možnosti jejich využití* (Bakalářská práce, Jihočeská univerzita, České Budějovice, Česká republika) Dostupné z webu https://theses.cz/id/glcdhm/Bakalsk_prce.pdf
2. Kettnerová, Karolína (2012). *Sucho, stres a odolnost rostlin* (Bakalářská práce, Univerzita Karlova, Praha, Česká republika) Dostupné z webu
3. Semencová, Barbora (2013). Využití plazmidů v genovém inženýrství. *Praktická maturitní zkouška z odborných předmětů: písemná práce*. Kladno: Střední zdravotnická škola a vyšší odborná škola zdravotnická.
4. Zihlová, Monika (2013). *Biodegradace organických polutantů* (Bakalářská práce, Masarykova univerzita, Brno, Česká republika) Dostupné z webu
http://is.muni.cz/th/379702/prif_b/Biodegradace_organickych_polutantu_Zihlova.pdf

7 Přílohy

7.1 Registr povolených GMO – souhrn

(Dostupné z webu http://www.mzp.cz/_C1256E7F0041C8C2.nsf/gmo-all?OpenView)

Název	Kategorie
Brambor AV43-6-G7 se změněným složením škrobu – oprávnění zaniklo	uvádění do životního prostředí
Brambor se změnou obsahu cukrů – oprávnění zaniklo	uvádění do životního prostředí
Brambor se změnou odolnosti k plísni bramborové – oprávnění zaniklo	uvádění do životního prostředí
Brambor se zvýšenou odolností k Phytophthora infestans – oprávnění zaniklo	uvádění do životního prostředí
Cukrová řepa H7-1 - oprávnění zaniklo	uvádění do životního prostředí
Cukrová řepa H7-1 - oprávnění zaniklo	uvádění do životního prostředí
Cukrové řepy SBVR111 x H7-1, SBVR111 a H7-1 - oprávnění zaniklo	uvádění do životního prostředí
Hrách setý	uvádění do životního prostředí
Hrách setý	uvádění do životního prostředí
Kukuřice DP-Ø9814Ø-6- oprávnění zaniklo	uvádění do životního prostředí
Ječmen jarní	uvádění do životního prostředí
Inhibitory replikace HIV	uzavřené nakládání
Kukuřice linie Bt11 x MIR604 x GA21 – oprávnění zaniklo	uvádění do životního prostředí

Kukuřice linie MIR162 – oprávnění zaniklo	uvádění do životního prostředí
Kukuřice linie Bt11 x GA21 – oprávnění zaniklo	uvádění do životního prostředí
Kukuřice linie Bt11 x MIR162 x MIR604 x GA21 – oprávnění zaniklo	uvádění do životního prostředí
Kukuřice linie GA21 – oprávnění zaniklo	uvádění do životního prostředí
Kukuřice MON 88017 - oprávnění zaniklo	uvádění do životního prostředí
Kukuřice MON 89034 × MON 88017 - oprávnění zaniklo	uvádění do životního prostředí
Kukuřice MON 89034 × NK603 – oprávnění zaniklo	uvádění do životního prostředí
Kukuřice NK603 x MON 810 - oprávnění zaniklo	uvádění do životního prostředí
Kukuřice označená kódy 6853, 6896, 6902, 6936 a 6981 - oprávnění zaniklo	uvádění do životního prostředí
Len setý	uvádění do životního prostředí
Len setý	uvádění do životního prostředí
Onkolytický adenovirus	uvádění do životního prostředí
Slivoň	uvádění do životního prostředí
Sója s genem LTB	uvádění do životního prostředí
Tabák viržinský	uvádění do životního prostředí